Fungal Fermentasyonla Statin Üretiminin Optimizasyonu

Burcu Atlı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Biyoloji Anabilim Dalı

Mart 2011

Statin Production Optimization by Fungal Fermentation

Burcu Atlı

MASTER OF SCIENCE THESIS

Department of Biology

March 2011

Fungal Fermentasyonla Statin Üretiminin Optimizasyonu

Burcu Atlı

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Lisansüstü Yönetmeliği Uyarınca
Biyoloji Anabilim Dalı
Genel Biyoloji Bilim Dalında
YÜKSEK LİSANS TEZİ
Olarak Hazırlanmıştır

Danışman: Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Mart 2011

ONAY

Biyoloji Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Burcu Atlı' nın YÜKSEK LİSANS tezi olarak hazırladığı "Fungal Fermentasyonla Statin Üretiminin Optimizasyonu" başlıklı bu çalışma, jürimizce lisansüstü yönetmeliğin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

Danışman : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

İkinci Danışman : -

Yüksek Lisans Tez Savunma Jürisi:

Üye : Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ

Üye : Prof. Dr. Nilüfer AKSÖZ

Üye : Prof. Dr. Güngör KANBAK

Üye : Yrd. Doç. Dr. Esra SUNGUR

Üye : Doç. Dr. Zeki YILDIZ

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Prof. Dr. Nimetullah BURNAK

Enstitü Müdürü

ÖZET

Bu çalışmada bazı makrofungusların 3-hidroksi-3-metil-glutaril Ko A redüktaz inhibitörü (lovastatin) üretimi taranmıştır. Taranan 136 izolattan 6 tanesinin lovastatin ürettiği belirlenmiştir. Lovastatin ürettiği belirlenen izolatlar arasından en yüksek üretime sahip izolatlar (OBCC 2002 ve *Pleurotus ostreatus* OBCC 1031) seçilerek lovastatin üretiminin optimizasyonları yapılmıştır.

Pleurotus ostreatus OBCC 1031 ve OBCC 2002 izolatlarından lovastatin üretimi için katı faz ve derin kültür fermentasyonlarında Plackett-Burman istatiksel tasarımı ile lovastatin üretiminde en etkin bileşen/koşullar seçilerek cevap yüzey metoduyla önemli parametrelerin seviyelerinin optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada Plackett-Burman deney tasarımı analizi sonucunda katı faz fermentasyonunda lovastatin üretimini artırıcı yönde etkileyen en etkili bileşenlerin OBCC 2002 izolatı için arpa, partikül boyutu; OBCC 1031 izolatı için ise arpa, yeast ekstrakt ve partikül boyutu olduğu belirlenmiştir. Derin kültür fermentasyonunda ise OBCC 2002 izolatı için glikoz, pepton, karıştırma hızı, NaCl ve tiamin, OBCC 1031 izolatının da glikoz, yeast ekstrakt ve karıştırma hızı olduğu belirlenmiştir. En etkili bulunan besiyeri bileşen ve koşulları OBCC 2002 izolatının full faktöriyel deney tasarımıyla optimize edilen katı faz fermentasyonu dışındaki tüm durumlarda Box-Behnken deney tasarımı ile optimize edilmiştir.

OBCC 2002 izolatının maksimum lovastatin üretimi (139.45 mg/g), 1-2 mm partikül boyutuna sahip % 70 nemlendirilen 5 gram arpada 28 ˚C' de 6 günlük katı faz fermentasyonu ile gerçekleşmiştir. Bu değer aynı izolatın derin kültürde elde edilen lovastatin üretimi değerinden 10 kat fazladır. OBCC 1031 izolatının maksimum üretimi (114.82 mg/l) ise 28 ˚C' de % 3 glikoz, % 1 yeast ekstrakt besiyeri içeriği ile oluşturulan 200 rpm' de çalkalamalı derin kültür fermentasyonu ile gerçekleşmiştir.

Anahtar Kelimeler: Makrofungi, Lovastatin, Katı faz fermentasyonu, derin kültür fermentasyonu, Plackett-Burman tasarımı, Yüzey cevap metodu

SUMMARY

In this study, 136 different macrofungi isolates were screened for 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl Co A reductase inhibitor (lovastatin) production. It was determined that only 6 isolates were able to produce lovastatin, among 136 macrofungi isolates. The highest production of lovastatin among macrofungi was obtained from the extracts of isolate OBCC 2002 and isolate *Pleurotus ostreatus* OBCC 1031.

Plackett–Burman statistical design was used to select to factors that have positive effects on lovastatin production and subsequently optimization of these parameters for production of lovastatin by isolate OBCC 2002 and isolate *Pleurotus ostreatus* OBCC 1031 was studied by response surface methodology using submerged and solid-state fermentation. In this study, the statistical analysis of Plackett–Burman experimental results showed that glucose, peptone, NaCl, thiamine, agitation speed, barley, and particle size for OBCC 2002; glucose, yeast extract, agitation speed, barley, particle size for *P. ostreatus* OBCC 1031 are significant components for the lovastatin production. The more significant medium components and culture condition were optimized using of the Box-Behnken design in all situations except for solid state fermentation of OBCC 2002 isolate that was optimized by using a full factorial design.

The maximum lovastatin production by isolate OBCC 2002 (139,45 mg/g) was carried out with the solid-state fermentation at 28 ˚C for 6 days by using barley 5 g with 1-2 mm particle size and 70 % humidity. This value was ten times higher than the amount of lovastatin production obtained by the submerged fermentation. For OBCC 1031 isolate, the maximum lovastatin production of 114,82 mg/l was obtained after 6 days of submerged fermentation period in the optimized medium containing, 3 % glucose, 1 % yeast extract at 200 rpm and 28 ˚C.

Keywords: Macrofungi, Lovastatin, Solid-state fermentation, Submerged fermentation, Plackett-Burman design, Response surface methodology

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmalarım süresince desteğini esirgemeyen ve değerli bilgileriyle çalışmama yön veren danışman hocam Sayın Doç. Dr. Mustafa YAMAÇ' a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu tezde kullanılan istatiksel tasarımların oluşumunda ve elde edilen sonuçların analizinde Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, İstatistik Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Doç. Dr. Zeki YILDIZ' a, yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Deneysel çalışmalar sırasında lovastatinin tanımlanması ve ölçümünde laboratuvarının kapılarını açan, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü öğretim üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Musa ŞÖLENER' e, değerli zamanlarını ayırıp teknik bilgileriyle yardımcı olan Fatih BURUKSU ve Talat Ozan DOĞAN' a teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Fungi kültür laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Son olarak sevgili annem Nuray ATLI, babam Mehmet Ali ATLI ve kardeşim Ayşegül ATLI' ya eğitim ve öğretim hayatım boyunca bana maddi, manevi her konuda destek oldukları ve her zaman güvendikleri için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Burcu ATLI

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET …….....v
SUMMARY ……vi
TEŞEKKÜR ……...vii
ŞEKİLLER DİZİNİ ……....x
ÇİZELGELER DİZİNİ ……....xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ…….....xv

1.GİRİŞ…….……1
1.1. Makrofunguslar ve Biyolojik Aktiviteleri…….....4
1.1.1. Antibiyotikler……....5
1.1.2. Antifungal ajanlar…….…....5
1.1.3 Antitümör ajanlar. ……6
1.1.4. Antiviral ajanlar …….……6
1.1.5. Mikotoksinler ve diğer metabolitler…..……...……....7
1.1.6. Hiperkolestorelemik ajanlar ……...7
1.2. Statinler…….…9
1.2.1. Statinlerin yapısı…….…….....9
1.2.2. Statinlerin biyosentezi……...11
1.2.3. Statinlerin etki mekanizması …….……...14
1.2.4. Statin üretici organizmalar……..……...16
2. MATERYAL ve METODLAR…….....18
2.1. Materyal……...18
2.1.1. Test mikroorganizmaları……...18
2.1.2. Pozitif kontroller……18
2.1.3. Çalışılan makrofungus kültürleri……...18
2.1.4. Besiyerleri……..……20
2.1.5.Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler……...…22
2.2. Metodlar ……...25

İÇİNDEKİLER (devam)

Sayfa

2.2.1. Statin üreticisi makrofungusların yarı kantitatif yöntem ile seçilmesi……..25
2.2.2. Statin üretiminin onaylanması……...…….27
2.2.3. Statin üretiminin deneysel tasarım yöntemleri ile optimizasyonu……...…….28
2.2.3.1. Statin üretiminde etkin besiyeri bileşen/koşullarının belirlenmesi…...29
2.2.3.2. Statin üretiminde etkin besiyeri bileşen/koşul seviyelerinin Belirlenmesi……...32
2.2.3.3. Analitik yöntemler…….37
2.2.3.3.1. Statinin kantitatif tayini…….37
2.2.3.3.1.1. Ekstraksiyon……...37
2.2.3.3.1.2. Tayin……..37
2.2.3.3.2. Total biyokütle tayini ……..39
2.2.3.3.3. Son pH'nın belirlenmesi……..39
3. BULGULAR……...40
3.1. Statin üreticisi makrofungusların yarı kantitatif yöntem ile seçilmesi…….40
3.2. Statin üretiminin onaylanması…….45
3.3. Statin üretiminin deneysel tasarım yöntemleri ile optimizasyonu…….……..47
3.3.1. OBCC 2002 izolatı tarafından statin üretiminin optimizasyonu……..50
3.3.1.1. Katı faz fermentasyonu ile statin üretiminin optimizasyonu ……...….51
3.3.1.2. Derin kültür fermentasyonu ile statin üretiminin optimizasyonu ……55
3.3.2. OBCC 1031 izolatı tarafından statin üretiminin optimizasyonu……..59
3.3.2.1. Katı faz fermentasyonu ile statin üretiminin optimizasyonu ……60
3.3.2.2. Derin kültür fermentasyonu ile statin üretiminin optimizasyonu ……65
3.3.3. Seçilen izolatların özellikleri…… ……70
4. TARTIŞMA ve SONUÇ ……71
4.1. Statin üreticisi makrofungusların yarı kantitatif yöntem ile seçilmesi…….73
4.2. Statin üretiminin onaylanması……..74
4.3. Statin üretiminin optimizasyonu……...…75
5. KAYNAK DİZİNİ……..83

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil **Sayfa**

Şekil 1.1. Kardiyovasküler hastalıkların sigara kullanımı, yüksek tansiyon ve yüksek kolesterol seviyesine bağlı risk düzeyleri……..….1
Şekil 1.2. Statinlerin temel yapısı …….....9
Şekil 1.3. Statin yan zincirlerin ana yapıdaki C8 (R1) ve C6 (R2) ile bağlantısı……10
Şekil 1.4. Statinlerin HMG-CoA redüktaz enzimine bağlanma bölgeleri…….....11
Şekil 1.5. Lovastatinin biyosentetik yol izi…….12
Şekil 1.6. Lovastatin biyosentez gen kümesi…….....13
Şekil 1.7. Statinlerin etki mekanizması…….....15
Şekil 2.1. Statin ekstraksiyonu ve biyotayininin genel akış şeması……25
Şekil 2.2. *N.crassa* ile gözlenen pozitif ve negatif kontrol……..26
Şekil 2.3. İnce tabaka kromotografisi…….....28
Şekil 3.1. Yöntem I ve Yöntem II ekstraktlarındaki olası statinin *N.crassa* inhibisyon zonları……40
Şekil 3.2. Elde edilen bazı ekstraktların *C.albicans* inhibisyon zonları.....41
Şekil 3.3. Elde edilen bazı ekstraktların *N.crassa* inhibisyon zonları…….....42
Şekil 3.4. Lovastatin standartlarının *C.albicans* ve *N. crassa* inhibisyonu ile oluşturulan standart eğrileri……...……43
Şekil 3.5. *C.albicans* inhibisyonu sonucu pozitif sonuç veren izolatların olası lovastatin miktarları……44
Şekil 3.6. *N.crassa* inhibisyonu sonucu pozitif sonuç veren izolatların olası lovastatin miktarları……44
Şekil 3.7. Fungal ekstraktların ince tabaka kromotografik analizleri……..46

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

Şekil **Sayfa**

Şekil 3.8. OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatları tarafından statin üretim koşullarının optimizasyonu süreci……...47
Şekil 3.9. Lovastatin standardının HPLC kromotogramı bu kromatogramdan elde edilen standart eğri……...……...48
Şekil 3.10. Katı faz ve derin kültür fermentasyonundan elde edilen bazı ekstraktların HPLC kromatogramı……...……...49
Şekil 3.11. Glukozamin standartlarına ait standart eğri…….....50
Şekil 3.12. OBCC 2002 izolatının katı faz ve derin kültür fermentasyonunda miselyal gelişimi……...…….51
Şekil 3.13. OBCC 2002 izolatının RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SSF)……..55
Şekil 3.14. İzolat OBCC 2002 RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SmF)……59
Şekil 3.15. OBCC 1031 izolatının katı faz ve derin kültür fermentasyonunda miselyal gelişimi……...……..60
Şekil 3.16. İzolat OBCC 1031 RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SSF)……64
Şekil 3.17. İzolat OBCC 1031 RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SmF)…….....68
Şekil 3.18. OBCC 1031 ve OBCC 2002 izolatlarının makro görüntüsü…….....70
Şekil 4.1. Lovastatinin Faz IIb çalışmalarında plazma kolesterolün değişimleri….....71

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 1.1. Endüstriyel öneme sahip fungal metabolitler……....5
Çizelge 1.2. Kolesterol ve lipidler üzerinde etkili olan bazı makrofunguslar……...8
Çizelge 1.3. Lovastatin üretimi için patent alınmış bazı üretim modelleri…….16
Çizelge 2.1. Statin üretimi açısından taramaya alınan makrofungus kültürleri……...19
Çizelge 2.2. Optimizasyon çalışmasında kullanılan bazı besiyeri bileşenleri ve kullanım amaçları……...…..24
Çizelge 2.3. OBCC 1031 ve OBCC 2002 izolatları tarafından statin üretiminin optimizasyonu için kullanılan kültür tipleri ve istatistiksel tasarımlar..….29
Çizelge 2.4. PB yaklaşımı ile 11 farklı besiyeri içeriği ile 12 farklı besiyerinin tasarımı…….…..30
Çizelge 2.5. Katı faz fermentasyonunda kullanılan değişkenler ve düzeyleri…….31
Çizelge 2.6. OBCC 2002 izolatının derin kültür fermentasyonunda kullanılan değişkenler ve düzeyleri……...……..31
Çizelge 2.7. Full faktöriyel deney tasarımında kullanılan oranlar (SSF)……....33
Çizelge 2.8. Full faktöriyel deney tasarımı ile oluşturulan besiyerleri (SSF)…….33
Çizelge 2.9. OBCC 2002 izolatı için Box-Behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri (SmF)……...……...34
Çizelge 2.10. OBCC 2002 izolatı için Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan besiyerleri (SmF)……..…….34
Çizelge 2.11. OBCC 1031 izolatı için Box-Behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri (SSF)……..……..35
Çizelge 2.12. OBCC 1031 izolatı için Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan besiyerleri (SSF)……..35

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 2.13. OBCC 1031 izolatı için Box-Behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri (SmF)……..……..36
Çizelge 2.14. OBCC 1031 izolatı için Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan besiyerleri (SSF)……..…… 36
Çizelge 2.15. Kullanılan HPLC cihazı özellikleri ve koşulları……...38
Çizelge 3.1. Farklı hareketli fazlarda lovastatin standardının Rf değerleri…….45
Çizelge 3.2. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı……..……...52
Çizelge 3.3. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SSF)……. 53
Çizelge 3.4. OBCC 2002 izolatının Full Faktöriyel Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SSF)……..……....54
Çizelge 3.5. OBCC 2002 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SSF)…54
Çizelge 3.6 OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı…….…….56
Çizelge 3.7. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SmF)…..…56
Çizelge 3.8. OBCC 2002 izolatının Box-Behnken Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SmF)……...……57
Çizelge 3.9 OBCC 2002 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SmF)…57
Çizelge 3.10. OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı (SSF)…….……...…61
Çizelge 3.11. OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SSF)……61
Çizelge 3.12. OBCC 1031 izolatının Box-Behnken Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SSF)……..……62
Çizelge 3.13. OBCC 1031 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SSF)..63
Çizelge 3.14. OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı (SmF)……..…….65
Çizelge 3.15 OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SmF)……66

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

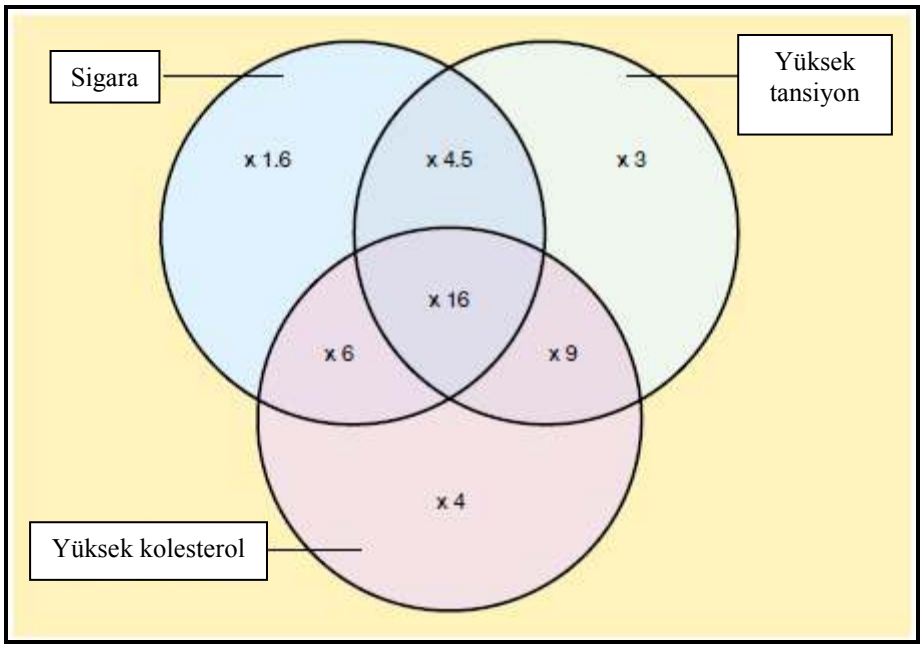
Çizelge 3.16 OBCC 1031 izolatının Box-Behnken Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SmF)……..……..66
Çizelge 3.17 OBCC 1031 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SmF)..67
Çizelge 3.18. Seçilen izolatların optimizasyondan önce ve sonra lovastatin miktarlarının karşılaştırılması……..……..…69
Çizelge 4.1. Katı faz fermentasyonu ile üretilen lovastatin miktarları……79
Çizelge 4.2. Derin kültür fermentasyonu ile üretilen lovastatin miktarları…….81

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

Simge	Açıklama
HMG	3-hidroksi- 3-metil glutaril
HMG-Ko A	3-hidroksi- 3-metil glutaril-koenzim A
LDL	Düşük yoğunluklu lipoprotein
HDL	Yüksek yoğunluklu lipoprotein
LNKS	Lovastatin nonketit sentez
PKS	Poliketit sentez
PB	Plackett-Burman
RSM	Cevap yüzey metodu
SSF	Katı faz fermentasyonu
SmF	Derin kültür fermentasyonu

1. GİRİŞ

Sanayileşmenin getirdiği olumsuz etkiler ve yaşam koşullarının değişmesiyle birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedenlerinden birisi de koroner kalp hastalıklarıdır. Tüm dünyada yılda 17 milyon, Türkiye' de ise yaklaşık 200.000 kişi yaşamını kalp ve damar hastalıklarına bağlı nedenlerden kaybetmektedir (Ulusal Kalp Sağlığı Politikası, 2007). Kardiyovasküler hastalıkların en önemli risk faktörleri olan sigara kullanımı, yüksek tansiyon ve yüksek kolesterol seviyesi arasında sinerjistik bir ilişki de vardır (Şekil 1.1). Bu yönü ile yüksek kolesterol seviyesi hastalık oranını 4 kat arttırması ile primer risk faktörüdür (Gaw, 2001). Kardiyovasküler hastalıkların da temel nedeni bilinen hiperkolesterolemi, koroner kalp hastalığı ve ateroskleroz (damar sertliği) için önemli bir risk faktörüdür. Birçok kontrollü çalışma LDL kolesterolün düşürülmesinin koroner olaylar riskini azalttığını rapor etmiştir (Heper, 2007).



Şekil 1.1. Kardiyovasküler hastalıkların sigara kullanımı, yüksek tansiyon ve yüksek kolesterol seviyesine bağlı risk düzeyleri (Gaw, 2001)

Hiperkolesterolemi tedavisinde birincil ilaç olarak kullanılan statinler, hepatik kolesterol oluşumunda hız kısıtlayıcı basamak olan 3-hidroksi-3-metil-3-glutaril koenzim A (HMG-Ko A) redüktaz enziminin yarışmalı inhibitörüdürler (Endo 1979; 2004; 2010). Statinlerin ana etkisi, total kolesterol ve düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) kolesterol düzeylerini düşürme üzerinedir. Ancak, bu grup içindeki bazı ilaçların yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol düzeylerini yükseltme ve trigliserit düzeylerini düşürme yönünde etkileri de vardır. Bu temel etkinin dışında, statinlerin pleiotropik etkiler (antioksidan, antienflamatuvar, endotel disfonksiyonunun geriletilmesi, trombüs oluşumu ve emboli üzerine etkileri) olarak adlandırılan bir takım lipit dışı etkileri de vardır (İrat ve Işık, 2006). Astım, kanser (özellikle prostat, kolon kanseri), Alzheimer ve Parkinson hastalıklarında, sistemik sklerozis ve son zamanlarda gribal enfeksiyonlarda (Frost et al., 2007; Infectious Disease Society of America, 2010) statinlerin pleiotropik etkileri görülmektedir (Mihos and Santana, 2011).

Koroner kalp hastalıklarının görülme sıklığının artmasıyla statinler en çok kullanılan ilaçlar listesinde yer almaya başlamıştır. Xiu-Sheng ve Chris' in 2003' te yaptığı araştırmada 2001 yılında dünya çapında simvastatin satışının 6.67 milyar dolar olduğu rapor edilmiştir. Sadece Amerika' da 2006 yılında kullanılan statinlerin piyasa değerinin ise, 12.8 milyon dolar olduğu bildirilmiştir (Barrios-González and Miranda, 2010). IMS Health' ın 2008 yılında yaptığı araştırmada dünyada en çok satılan ilaçların başında Lipitor (atorvastatin) gelmektedir (http://www.imshealth.com/).

Statinler, *Penicillium citrinium* (ilk statin, mevastatin), *Aspergillus terreus* (lovastatin) gibi bazı funguslar tarafından üretilen sekonder metabolitlerin bir grubudur. 1979 yılında Japon bilim adamı Akira Endo, *Monascus* spp. tarafından üretilen bir metabolitin sıçanların kanındaki yüksek lipoprotein miktarını azalttığını belirleyerek, bu metaboliti "monakolin" olarak adlandırmıştır. Monakolin (farmasötik adı lovastatin) Merck co. şirketi tarafından ("Mevacor" ismi ile) ticari olarak piyasaya sürülmüştür. Bununla birlikte statinlerin etkisini artırmak amacıyla yarı sentetik (simvastatin; "Zocor") ve sentetik (atorvastatin; "Lipitor") statinler geliştirilerek üretimi sağlanmıştır.

İlaç sektöründe büyük yere sahip olan statinlere talebin artmasıyla birlikte ticari boyutta üretim ihtiyacı ortaya çıkmıştır. Yapılan birçok çalışmada derin kültür fermentasyonu ile *Aspergillus terreus* tarafından lovastatin üretimi yapılmıştır (Chang et al., 2002; Casas López et al., 2003, 2004a, b, 2005; Vilches Ferrón et al., 2005). Son

zamanlarda araştırmacılar, tarımsal atıklar gibi ekonomik substratların kullanılabilmesi, kolay uygulanması, az enerji gerektirmesi gibi avantajlarından dolayı derin kültür fermentasyon yöntemine alternatif olan katı faz fermentasyonuna yönelmişlerdir. Katı faz fermentasyonu genel olarak endüstriyel enzimlerin üretiminde kullanılmasına rağmen günümüzde birçok sekonder metabolitin üretimi için kullanılır hale gelmiştir. Lovastatin üretimi için de katı faz fermentasyonunun etkili bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Jaivel and Marimuthu, 2010).

Sekonder metabolitlerin laboratuvar koşullarında üretimi esnasında miktarı ve çeşitliliği, ortamdaki besinlerin oranı ve farklılığına göre de değişebilmektedir (Adrio and Demain, 2003). Fermentasyon ortamlarına büyümeyi sınırlayıcı etkisi olan karbon kaynağı eklenmesi ya da fosfatın azaltılması gibi değişiklikler çeşitli metabolitlerin üretiminde artışa veya azalışa neden olmaktadır. Bu nedenle lovastatinin üretimi, çeşitli besinsel ve çevresel koşulların düzenlenmesi ile optimize edilmeye çalışılmaktadır. Bu amaçla gerçekleştirilen birçok çalışmada, karbon ve azot kaynaklarının tipi, konsantrasyonları, oksijen ihtiyacı, pH, vitamin veya antibiyotik ile destekleme gibi besiyeri içeriği ve üretim koşullarının etkisi belirlenmeye çalışılmıştır (Szakács et al., 1998; Kumar et al., 2000; Hajjaj et al., 2001; Lai et al., 2004; Barrios-Gonzàles et al., 2005; Bizukojc et al., 2007; Jia et al., 2010).

Lovastatin üretiminde etkili olabilecek her bir parametrenin üretime etkisini ayrı ayrı incelemek hem masraflı hem de uzun bir süreci kapsar. Bu nedenle fermentasyon sürecinin optimizasyonu için çeşitli istatiksel deney tasarımları geliştirilmiştir. Plackett-Burman (PB) deney tasarımı, çok sayıda bağımsız değişkenin etkisini belirlemeye olanak tanır (Plackett and Burman, 1946; Chakravarti and Sahai, 2002). Bu deney tasarımında, deney sayısı (n+1) bağımsız değişkenlerin (n) etkisini tarayan iki faktöriyel tasarımdır. Bu tasarımdan elde edilen verilerin değerlendirilmesi ile lovastatin üretiminde hangi değişkenlerin daha fazla etkili olduğu belirlenebilmektedir. Etkili değişkenler besiyeri bileşenleri ya da çevre koşulları olabilir (Gunde-Cimerman et al., 1973; Shindia, 2001; Konya et al., 1998; Casas Lopez et al., 2004; Atalla et al., 2008; Panda et al., 2008; Aryantha et al., 2007; 2010). Ticari boyutta üretime geçmeden önce lovastatin üretimi için hangi değişkenlerin etkili olduğunun belirlenmesi kadar optimal miktar/seviyelerinin belirlenmesi de çok önemlidir. Bu amaçla kullanılan yöntemlerin en popülerlerinden birisi de cevap yüzey metodolojisi (Response Surface Method;

RSM) dir. Bu deney tasarımında ise, bağımsız değişkenler arasındaki ilişki ve seviye belirlenir. İstatiksel metodlar tekrarlanabilir ve güvenilir olma avantajlarına sahiptirler. PB ve RSM deney tasarımları bazı mikroorganizmalardan lovastatin üretimini optimize etmek amacı ile kullanılmıştır (Gomes and Malcata, 1998; Chakravarti and Sahai, 2004; Sayyad et al., 2007). Optimize edilmiş fermentasyon koşullarında lovastatin üretiminin artırılması üzerine yapılan çalışmalarda azot ve karbon kaynağı ve miktarının etkisi, istatiksel analizlerle birlikte oksijen miktarı gibi temel parametrelerde Box-Behnken dizaynı kullanılmıştır (Casas-López et al., 2004; Panda et al., 2008; Subhagar et al., 2009; Pansuriya and Singhal, 2010).

Lovastatin üretimi yüksek olan *A. terreus* kültürünün fermentasyonu sıvısı ekstraksiyonunda lovastatin dışında çeşitli ko-metabolitlerin üretildiği belirlenmiştir. Ko-metabolitlerden benzofenon, sulokrinin poliketit biyosentez yol izinde yer aldığı bilinmektedir. Lovastatinle birlikte sitrinin (*Monascus* türleri), aflotoksin (*Aspergillus* türleri) gibi toksik metabolitlerin de üretildiği rapor edilmiştir (Hajjaj et al., 2005; Cox and Simpson, 2009). Bu durum ticari lovastatin üretim sürecinde saflaştırma sürecinde zorluk yaratmakta ve toksisite konusunda ek analizler yapılması gibi zorunlulukları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle çalışmalar daha az toksik metabolit üreten ya da toksik metabolit üretmeyen makrofunguslar üzerine odaklanılmıştır (Gunde-Cimerman et al., 1993; Lee et al., 2006; Lai et al., 2007; Bizukojc and Ledakowicz, 2008).

1.1. Makrofunguslar ve Biyoaktif Bileşikler

Makrofunguslar yüzyıllardır gıda maddesi ve doğal ilaç olarak çeşitli toplumlar tarafından değerli bulunmuştur. Karbonhidrat ve yağ içerinin düşük olmasıyla birlikte protein, vitamin, kitin ve mineraller açısından oldukça zengin içeriğe sahiptirler (Poucheret et al., 2006; Chang et al., 2011). Uzakdoğu ülkelerinde makrofunguslar geleneksel bir ilaç olarak kullanılmışlardır. Yapılan çalışmalarda mantarlar tarafından üretilen biyolojik aktif bileşiklerin antioksidan, antimikrobiyal, antifungal, antialerjik, antitümör ve hiperkolesterolemik aktivitelerinin olduğu, insan sağlığı açısından önemi ortaya konulmuştur. Biyoteknolojik yöntemlerin geliştirilmesiyle son 20 yılda makrofunguslardan biyoaktif bileşiklerin üretimi ve yeni bileşiklerin keşfi üzerine yapılan çalışmaların sayısı artmıştır. Üretilen sekonder metabolitlerin birçoğu doğal

tıbbi kaynak olarak kullanılmaktadır. Bazı sekonder metabolitler tıbbi ve ticari öneme sahiptirler (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. Endüstriyel öneme sahip fungal metabolitler (Enman, 2007)

Fungal sekonder metabolit	**Mikroorganizma**
Penisilin G ve V	*Penicillium chrysogenum*
Griseofulvin	*Penicillium griseofulvum*
Sitrik asit	*Aspergillus niger*
İtakonik asit	*Aspergillus terreus*
Mikrobiyal protein (Quorn^{TM})	*Fusarium venenatum*
Lovastatin	*Aspergillus terreus*
α-Amilaz	*Aspergillus oryzae*
Ergot Alkaloidleri	*Claviceps purpurea*

1.1.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bazı bakteri veya fungus türleri tarafından üreme ortamlarında oluşturulan ve terapötik dozlarda başka mikroorganizmalar için mikrobiyostatik ya da mikrobisid etki gösteren ve tedavide kullanılan kimyasal maddelerdir. 23000'in üzerinde bilinen mikrobiyal sekonder metabolitin %42'si funguslar, %42'si aktinomisetler ve %16'sı da diğer bakterilerce üretilmektedir (Oskay ve Tamer, 2009). Filamentöz funguslar tarafından üretilen 12,000 üzerinde antibiyotik tanımlanmıştır (Ma et al, 2009). İlaç sektöründe doğal kaynaklı Penisilin G ve biyosentetik penisilin V' nin pazar payı 4.4 milyar dolar iken yarı sentetik penisilinler ve sepalosporinlerin piyasa değeri 11 milyar dolardır.

1.1.2. Antifungal ajanlar

Antifungal ajanlar, fungal hücre membranın da protein yapısında bir makromolekül olan ve hücre duvarının yapısal bütünlüğünü sağlayan 1,3-D glukan sentezini inhibe eder. Bunun sonucunda duvar bütünlüğü, hücre morfolojisi bozulur ve hücrenin ölümü ile sonuçlanır. Yıllarca konvansiyonel amfoterisin-B deoksikolat (Am

B-d) hem maya hem küf mantarlarına etkili olduğu için antifungal tedavide ilk seçenek olmuştur. Antifungal terapide ekinokandinler ve sordarinler önemli potansiyele sahiptir. İlk ekinokandin türevi ekinokandin B bir fungusid olan *Aspergillus nidulans* var. *Echinulatus* fungusundan identifiye edilmiştir (Misiek and Hoffmeister, 2007).

1.1.3. Antitümör ajanlar

1940 yılından beri 100.000 üzerinde doğal antitümör ilaç tanımlanmıştır. En çok bilinen doğal antikanser ajanı taksol, ilk kez bitkilerden ekstrakte edilmiştir. Ancak üretimi *Taxomyces andreanae* fungusu ile yapılmaktadır. Akciğer ve ovaryum kanserlerinde mikrotübüllerin depolimerizasyonunu bloke ederek antitümör etki gösterdiği bilinmektedir. 2000 yılında taksol' un piyasa değeri 1 milyar doları bulurken dünyada en çok satılan üçüncü ilaç olarak kayıtlara geçmiştir. Makrofunguslar tarafından üretilen lentinan, shizophyllan gibi bazı ekzopolisakkaritlerin antitümör ajan olarak görev yaptığı rapor edilmiştir (Wasser, 2002).

1.1.4. Antiviral ajanlar

Fungal sekonder metabolizma sonucunda üretilen bazı metabolitler virüs replikasyonunu inhibe eden "virositatik" etki gösterirler. *Fusarium* türlerinden elde edilen bazı biyoaktif bileşiklerin antiviral özellik taşıdıkları rapor edilmiştir (Lindequist et al., 2005). Özellikle hepatit C virüsünün spingolipid sentezindeki ilk adımda yer alan kritik öneme sahip serin palmitoyiltransferaz enzimini inhibe ederek replikasyonu durdurur. Son zamanlarda viral infeksiyonların (domuz gribi, kuş gribi vb.) artmasıyla birlikte yeni antiviral ajanlar önem kazanmıştır. Shiitake mantarı olarak bilinen *Lentinus edodes*' den üretilen lentinan, Reishi mantarı olarak bilinen *Ganoderma lucidum*' dan üretilen ganaderiol-F, ganoderik asit-ß, lusidumol metabolitlerinin antiviral etkisi olduğu bilinmektedir. Çoğu antiviral ajanların karakterizasyonu yapılmamış olmasına rağmen *Inonotus obliquus* ve *Polyporus umbellatus* makrofunguslarından sıcak su ekstraktlarında aktivitelerinin varlığı gösterilmiştir (Stamets, 2005).

1.1.5. Mikotoksinler ve diğer metabolitler

Mikotoksinler, *Aspergillus, Penicillium, Fusarium, Alternaria* başta olmak üzere bazı filamentöz funguslar tarafından üretilirler. En çok bilinen mikotoksinler aflatoksinler, okratoksin, trikotesen, zearalenon, patulin ve fumonisindir. Mikotoksinler, karsinojenik, teratojenik ve mutajenik etkilerinin yanı sıra, hepatotoksisite, hepatokarsinojenite, nefrotoksisite, immün sistemin bozulması ile hastalıklara karşı yatkınlık, büyümenin yavaşlaması, üreme fonksiyonlarının bozulması gibi pekçok toksik etkiye neden olabilirler. Toksik etkilerinin yanı sıra bazı sekonder metabolitlerin olumlu etkileri de bulunmaktadır. Örneğin, *Gibberella fujikuroi* tarafından üretilen giberellinler, bitki büyüme hormonu olarak kullanılarak ürün verimini ve miktarını arttırılar (Ünyayar, 2000; Cihangir, 2002; Karakoç ve Aksöz, 2006; Misiek and Hoffmeister, 2007). *Claviceps* spp., *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. ve *Rhizopus* spp. tarafından üretilen ergot alkaloitler migren, anjin, hipertansiyon gibi hastalıkların tedavisinde çok sık kullanılmaktadır. Halojenik lazersik asit dietilamit en çok bilinen ergot türevidir (Küçük vd., 2003). Ayrıca ergotamin tartarat farmasötik bir ilaç olarak da kullanılmaktadır. Cyclosporin A, *Fusarium solani, Neocosmospora varinfecta* ve *Tolyxpocladium inflatum*' dan üretilen bir metabolit olup kalp, karaciğer ve böbrek nakline gerek duyan hastalarda kullanılmaktadır.

1.1.6. Hiperkolesterolemik ajanlar

Günümüzde hiperkolesterolemik etkiye sahip metabolit üreten birçok mantar tanımlanmıştır (Çizelge 1.2). Başlıca HMG-Co A redüktaz ve inhibitörleri (statinler) olmak üzere skualen sentaz (SQS) inhibitörleri, protein preniltransferaz inhibitörleri (PFT), Açil-Co A: Kolestrol açiltransferaz (ACAT) inhibitörleri, kolesterilester transfer protein (CETP) inhibitörleri ve kolestrol metabolizmasının diğer inhibitörleri olmak üzere makrofunguslar tarafından hiperkolesterolemik aktivite gösteren biyolojik aktif bileşikler üretilmektedir. Skualen sentaz inhibitörleri, izoprenoid ara ürünlerinden sonraki basamakta *de novo* kolesterol sentezini inhibe eder. *Ganoderma lucidum* dışındaki mantar türlerinde ve primatlarda, fungal metabolitlerin zaragozik asit üzerinden skualen sentetazı inhibe ettiği bildirilmiştir. Klavarik asit basidiomycetes *Clavarariadelphus truncatus*' dan izole edilmiştir.

Çizelge 1.2. Kolesterol ve lipidler üzerinde etkili olan bazı makrofunguslar (Guallimón vd., 2010)

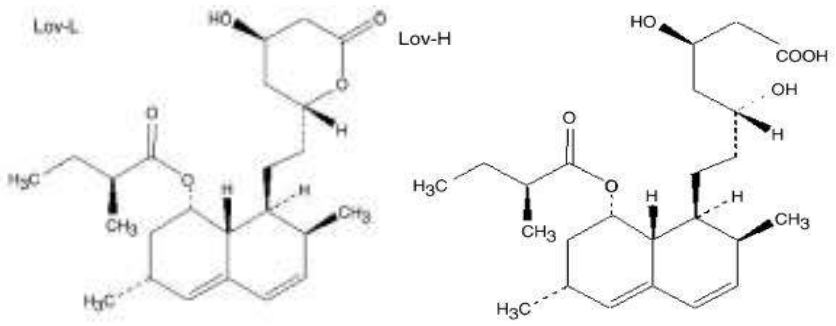
1. Toplam kolesterol seviyesini düşürenler	
Auricularia auricula	*Grifola frondosa*
Cordyceps sinensis	*Pleurotus ostreatus*
Ganoderma lucidum	*Tremella fuciformis*
Pleurotus citrinopiletus	*Pleurotus florida*
2. LDL- kolesterol seviyesini düşürenler	
Auricularia auricula	
Tremella fuciformis	
Agaricus bisporus	
3. Trigliserid seviyesini düşürenler	
Cordyceps sinensis	
Grifola frondosa	
Lentinus edodes	

Çeşitli sterolseven PFT inhibitörleri bazı funguslardan izole edilmiştir. Antisektan taramasında *Eupenicillium reticulisporum*' dan piripiropen A izole edilmiştir. Diğer üç seskuiterpen ACAT inhibitör analoğu olan piripiropenler Güney Kore' de toprak fungusu olan *A. Fumigatus*' tan elde edilmiştir. 2002 yılında Rho ve ark. tarafından *Penicillium griseofulvum* ile fermentasyon yapılırken fenilpiropen C keşfedilmiştir. Epi–kokliokuonin A, Sankyo bilim adamları tarafından *Stachybotrys bisbyi* fermentasyonuyla elde edilmiştir. Yeni geliştirilmiş kolesteril ester transfer protein (CETP) inhibitörleri olan torcetrapib ve JTT-705, proteine disülfid bağıyla geri dönüşümsüz olarak bağlanarak plazma CETP miktarının artmasına, dolayısıyla HDL-kolesterol düzeylerinde artışa ve antiaterosklerotik etkilere yol açar. Kitasato ve Pfizer bilimadamları CETP inhibitörlerini bir fungus olan *Fusarium sp.*' nin sıvı fermentasyonu ile yüksek miktarlarda elde etmişlerdir.

1.2. Statinler

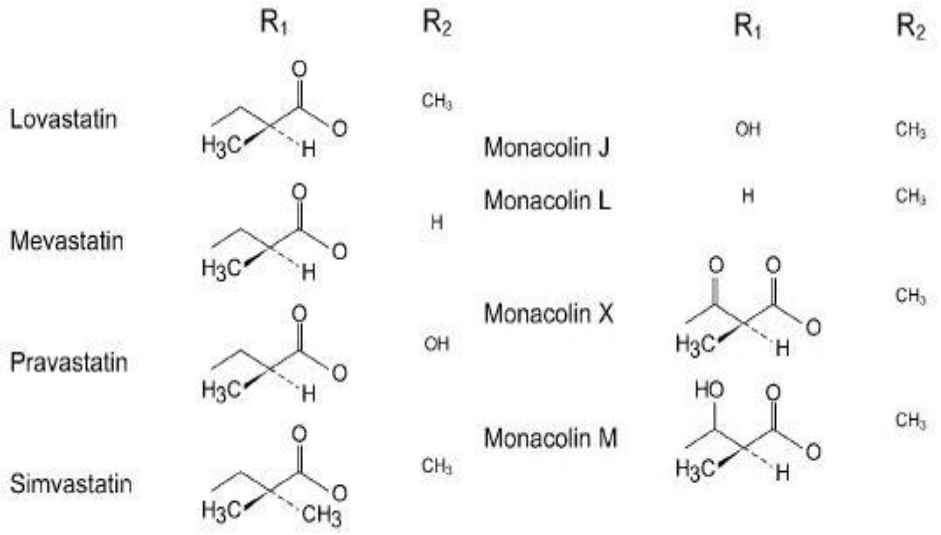
1.2.1. Statinlerin Yapısı

Statinler genel olarak kimyasal yapıları nedeniyle üç kısma ayrılırlar. Birincisi hedef enzimin substratı olan HMG Co A analoğu, ikincisi substrat analoğu olan kısma kovalent bağlı olan ve statini enzime bağlama işlevi gören kompleks hidrofobik halka yapısı ve üçüncüsü pek çok farmakokinetik özelliklerini belirleyen halka yapılarına bağlı yan gruplardır. Tüm statin molekülleri ana poliketit kısmı, hidroksi hekzahidro naftalin halka sistemine sahiptir (Şekil 1.2). Bu halkaya C8 (R1) ve C6 (R2) farklı yan zincirler bağlanır.



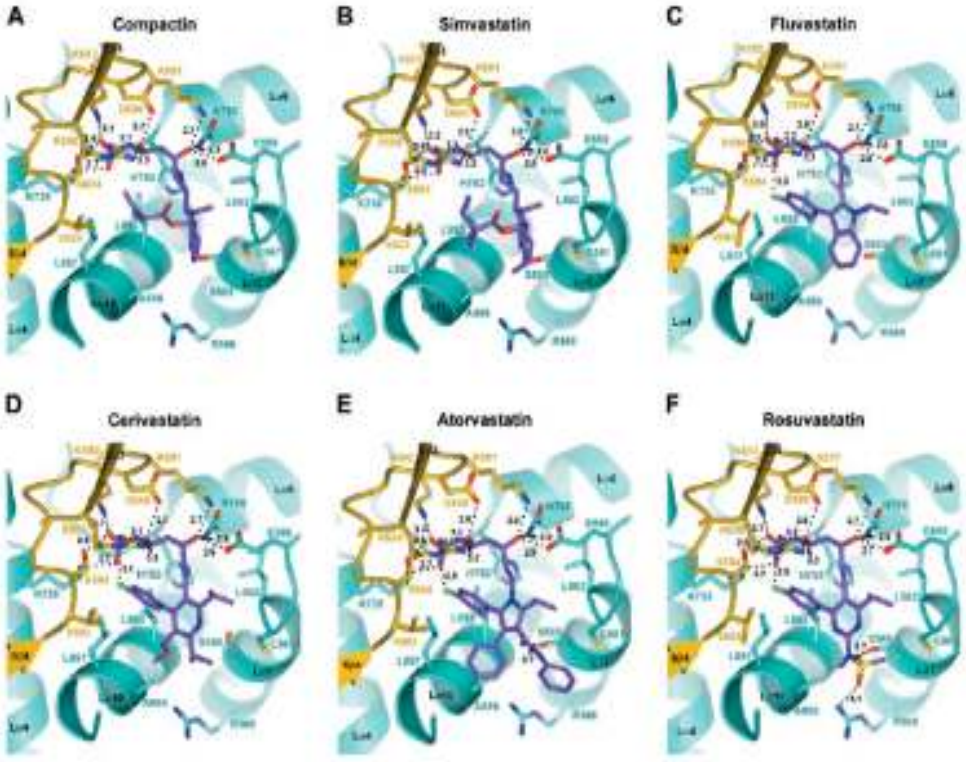
Şekil 1.2. Statinlerin temel yapısı (Lov-L: Lakton formu; Lov-H: Hidroksi asit formu)

Statinler, doğal ve sentetik olmak üzere ikiye ayrılırlar. Mevastatin (kompaktin) ve lovastatin doğal, fluvastatin, simvastatin, atorvastatin, cerivastatin, rosuvastatin ve pravastatin sentetik statinlerdir. Lovastatin ($C_{24}H_{36}O_5$, mevinolin, monakolin K), mevastatinden farklı olarak 6-α metil grubu (R2) ve metilbütirik zincirini (R1) içerir. Simvastatinde, zincirin 2. pozisyonun da bir metil grubu mevcuttur (Şekil 1.3). Lovastatin biyosentezinde önemli rol oynayan monakolin J ve L'de, lovastatinde yer alan metilbütirik zincir bulunmaz. Monakolin J 'nin C8 bağlanma noktasında bir hidroksil grubu vardır (Endo and Hasumi, 1985; Manzoni and Rollini, 2002; Seenivasan et al., 2008). Sentetik statinlerin (atorvastatin, fluvastatin, cerivastatin, rosuvastatin) yapıları doğal statinlerden oldukça farklıdır. Sentetik statinlerde florofenil ve polar metan sulfomid grupları bulunmaktadır.



Şekil 1.3. Statin yan zincirlerin ana yapıdaki C8 (R1) ve C6 (R2) ile bağlantısı (Manzoni and Rollini, 2002)

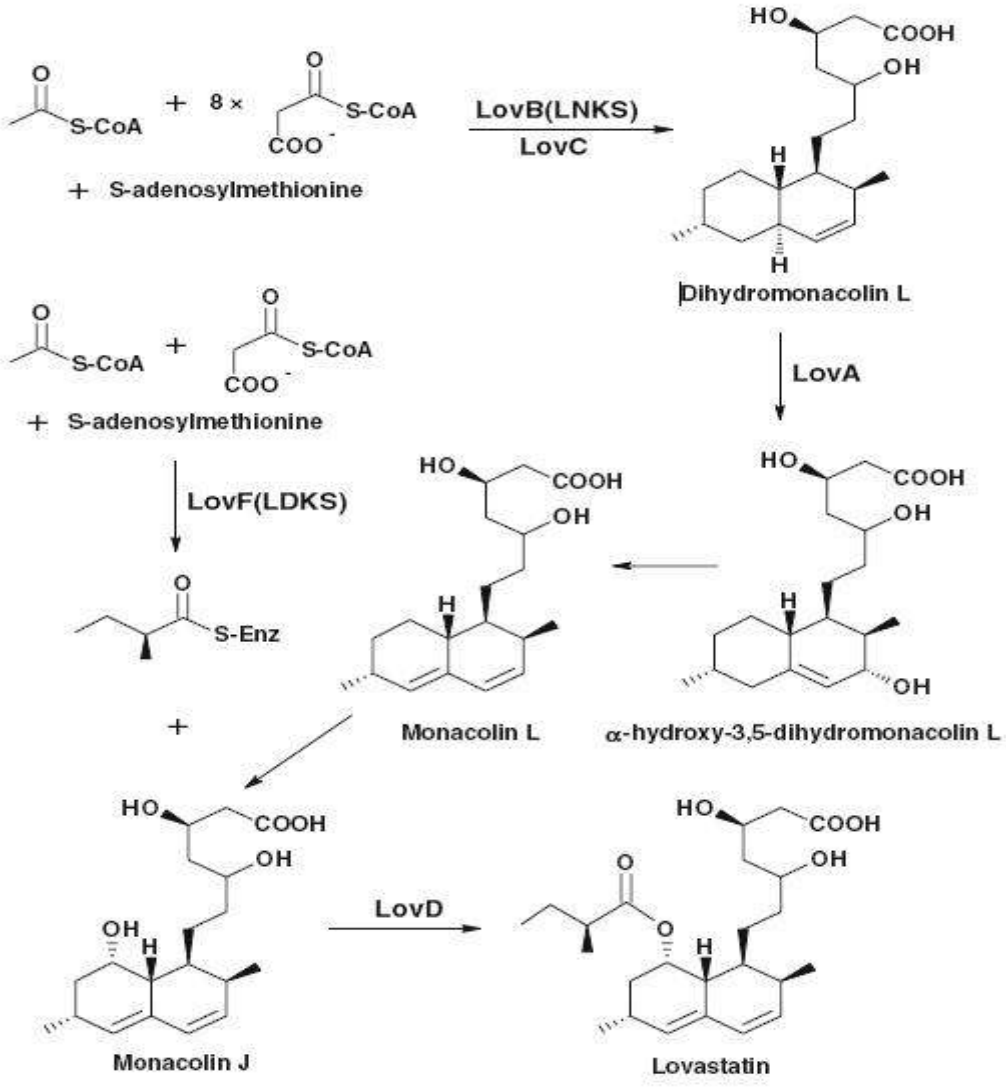
Statinler lakton formunda iken inaktif, β-hidroksi asit formunda ise aktiftir. Simvastatin, atorvastatin, fluvastatin ve lovastatin nispeten lipofilik bileşikler iken, pravastatin ve rosuvastatin hidrofilik yapıdadırlar (Sinensky and Logel, 1983; Tabernero et al., 2003). Istvan ve Deisenhofer, 2001 yılında elektron yoğunluklu harita ile statinlerin HMG-CoA redüktaz enzimine bağlanma bölgelerini ve bunların kendi içinde farklılıklarını belirlemiştir (Şekil 1.4). Bağlantı bölgelerinin sayısı, HMG-Co A redüktaz enzimine bağlanma affinitesini belirler. Bağlantı bölgelerinin artmasıyla HMG-Co A redüktaz enzimine bağlanma afinitesi artar. Sentetik statinlerde yer alan florofenil ve polar metan sulfomid grupları HMG Co A redüktaz enzimine bağlanma afinitesini artırırlar.



Şekil 1.4. Statinlerin HMG-Co A redüktaz enzimine bağlanma bölgeleri. A ortak bağlantı bölgesini göstermektedir. B, C, D ortak bağlanma bölgesinden başka bağlantı bölgeleri bulunmamaktadır. E 'de ortak bağlanma bölgesinden farklı bir, F' de farklı iki bağlantı bölgesi bulunmaktadır (Istvan and Deisenhofer, 2001).

1.2.2. Statinlerin Biyosentezi

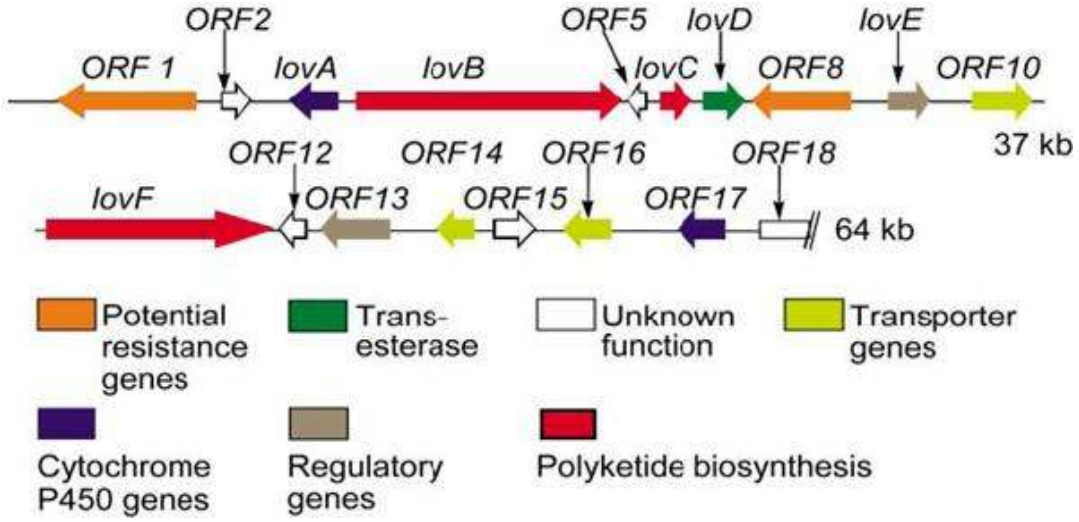
Lovastatinin üretimi asetat üniteleri ile başlar. İki poliketit zinciri bağlandıktan sonra asetat ve metiyoninden monakolin L ürünü oluşur. Monakolin L'nin monooksigenaz ile hidroksilasyonundan monakolin J oluşur. Monakolin J'nin esterifikasyonu ile son ürün lovastatin üretilir (Şekil 1.5). Funguslar tarafından üretilen statin β hidroksi asit formundadır. Lovastatin biyogenezininin araştırılmasında model organizma olarak *Aspergillus terreus* suşları kullanılmaktadır. *A. terreus* 'un lovastatin üretimindeki sekonder metabolik yol izi poliketit yolizidir. Poliketit yolizinin öncül maddesi AsetilCoA' dır. Karboksilasyonu Malonil CoA formu ile yapılır.



Şekil 1.5. Lovastatinin biyosentetik yol izi (Sorensen et al., 2002; Jia et al, 2010)

Fungal metabolizma da genellikle statinlerin yan zincirinde bulunan metil grubu bazı funguslarda C6 metiyoninden türetilerek halka yapısı kapanmadan zincire eklenir. Sonra ana zincir halkasal hale geçer ve bazı statinler C8 yan zincirler tarafından esterlenir. Ana zincirdeki oksijen atomları, öncül madde de bulunan oksijenin uzaklaştırılmasıyla yapılan aerobik oksidasyondan sonra eklenir. Yapılan bazı çalışmalarda C8' in enzimatik hidrolizasyon ve sonrasında esterifikasyonun *Penicillium citrinum* ve *Monascus ruber*' de aynı olduğu görülmüştür (Seenisavan et al., 2008).

Son zamanlarda yapılan araştırmalarda *A.terreus* ile lovastatin biyosentezinin ekspresyonu, gen regülasyonu ile birlikte enzimatik kinetikleri çalışılmıştır. Genetik çalışmalarda lovastatin üretiminde önemli rolü olan iki poliketit zincirinin mekanizmaları incelenmiştir (Şekil 1.6). *A. terreus*' un lovastatin üretimi bloke edilmiş mutant suşlarında, multifonksiyonel poliketit sentaz sistem (PKSs), lovastatin nonketit sentazdan (LNKS) oluşur. LNKS, monakolin J 'den metilbütiril yan zincir transferini sağlayan diketit sentaz (LDKS) ve hekzahidronaftalin halka sitemi formundan ana poliketit zincir siklizasyonunu kapsar.



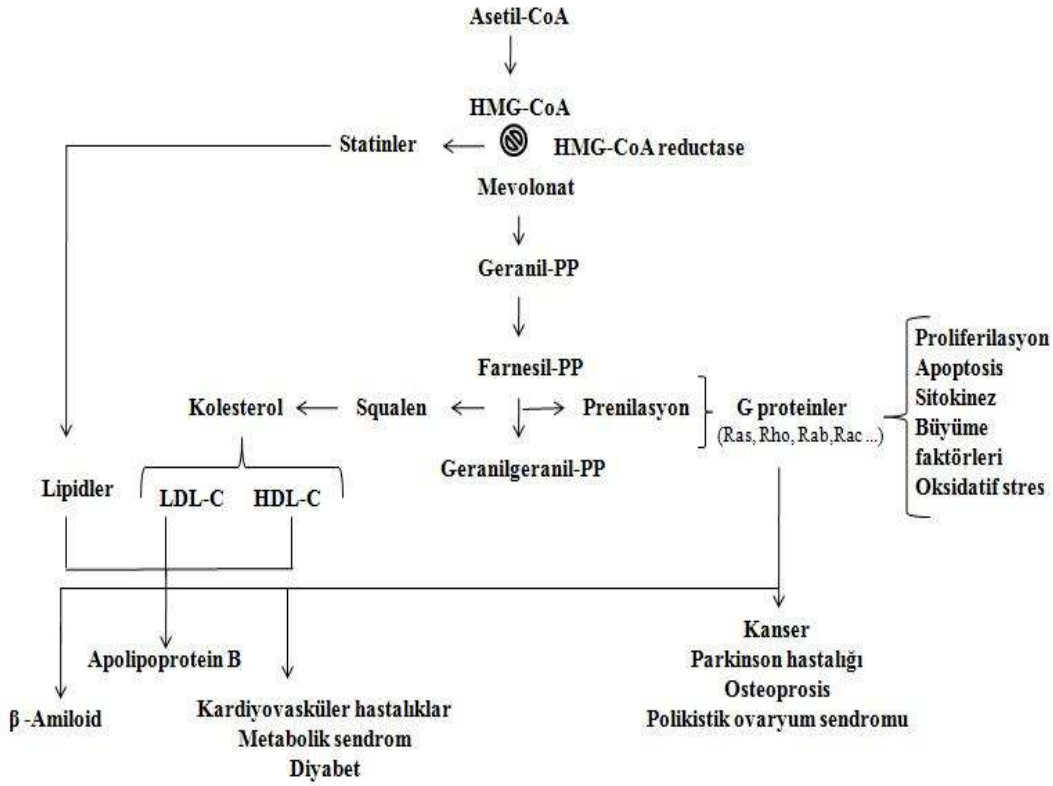
Şekil 1.6. Lovastatin biyosentez gen kümesi (lovB ve lovF poliketit biyosentezi; lovC enoil redüktaz; lovD transesteraz; lovE ve lovH regülatör genler; ORF2 ve ORF17 sitokrom P-450 genleri; ORF1 ve ORF10 potansiyel direnç genleri; ORF14 ve ORF16 taşıyıcı genler; lovG, ORF2, ORF12, ORF15, ve ORF18 fonksiyonu bilinmiyor) (Manzoni and Rollini, 2002; Sorensen et al., 2002)

Lovastatin nonketit formları, PKS'nin birincil yapısı lovastatin biyosentezi hakkında yeni bilgiler ortaya koyulmuş, lovastatin biyosentezinde PKSs nin tüm fonksiyonu araştırılmaya çalışılmıştır (Hendrickson et al., 1999; Askenazi et al., 2003; Hoffmeister and Keller, 2007; Ma et al., 2009; Cox, 2007; Campbell and Vederas, 2010). LNKS, dihidromonakolin L'yi oluşturan biyosentetik yolizinin ilk basamağındaki reaksiyonları katalizleyen lovC ile etkileşen lov B geninin ürünüdür. Lovastatin üretimindeki son basamakta LDKS, monakolin L den türetilen monakolin J de ki 2-metilbütirik asitin bağlanmasını katalizleyen lovD (transesteraz enzim) ile

etkileşen lovF tarafından yapılır. *A. terreus* ile lovastatin üretiminde düzenleyici faktörler ve bazı enzimleri kodlayan genlerin temel özellikleri araştırılmıştır (Hendrickson et al., 1999; Kennedy et al., 1999; Hutchinson et al., 2000). Dihidromonakolin L gibi aynı stereokimyasal halkalarla bisiklik sistem formu, *A. nidulans*'tan saflaştırılan LNKS tarafından katalizlenir. *A. terreus* ile yapılan başka bir çalışmada lovC geni bloke edilerek lovastatin biyosentezinde rol oynayan post-PKS (post-poliketit sentaz) basamakları araştırılmıştır. Çalışma sonucu lovC protein rolünün lovB protein yardımıyla lovastatindeki nonketit zincirin doğru eklenmesini sağladığı belirlenmiştir. Aksine LDKS (lovF protein) tarafından metilbütirat yan zincirinin yapımında lovC proteini gerekli olmadığı ve dihidromonakolin L'nin post-PKS sürecinde lovC proteinin bir fonksiyonu bulunmamıştır. Lovastatin biyosentezinde rol alan genlerden ORF1 veya IvrA geninin organizmaya lovastatine karşı direç kazandırdığı bilinmektedir. Lovastatine duyarlı olan *A. nidulans*' ın bu gene sahip olduktan sonra lovastatine dirençli hale geldiği Hutchinson ve arkadaşları (2000) tarafından rapor edilmiştir. *A.terreus* 'un lovastatin biyosentezinde, lovastatinin kendi üretimini inhibe ettiği düşünülen geri besleme kontrol mekanizması olduğu tanımlanmıştır. Bu geri besleme kontrol mekanizması etkisizleştirildiğinde lovastatin üretiminin artabileceği düşünülmektedir (Casas López et al., 2004). Poliketit antibiyotiklerinin bu mekanizma üzerinde etkili olduğu ve lovastatin üretimini artırdığı gösterilmiştir (Jia et al., 2010).

1.2.3. Statinlerin Etki Mekanizması

Statinlerin hipokolestrolemik aktivitesi, HMG-Co A ara formunun ve statinlerin β-hidroksi asit formu arasındaki yapısal homoloji nedeniyle HMG-Co A redüktaz enziminin kompetetif inhibisyonuna dayanır. Statinlerde bulunan lakton halkası hücre içinde β-hidroksi asit formuna dönüşür (Alberts et al., 1980). Kolesterol biyosentezinde statinlerin ilk adımı kolesterol sentezinde öncül madde olan mevolanat üretiminin azaltımasıdır. HMG-Co A redüktaz inhibisyonuyla, izoprenoidlerin sentezi ve kolesterol sentezinde rol alan mevolanatın iki önemli ürününün yol izi etkilenir (Şekil.1.7).



Şekil 1.7. Statinlerin etki mekanizması (Barrios-González and Miranda, 2010)

Hücre içi kolesterol sentezindeki azalmanın aktifleştirdiği proteaz ile sterol düzenleyici element bağlayıcı proteinler endoplazmik retikulumdan ayrılarak çekirdeğe gider ve düşük dansiteli lipoprotein (LDL) reseptör gen ekspresyonunu artırır. Bu sayede karaciğerde reseptör aracılı LDL endositozu artar ve serum LDL seviyeleri düşer (Istvan and Deisenhofer, 2001). Bu şekilde statinlerin kolesterol düşürücü etkileri bir yandan hücre içi sentezi azaltıp, diğer yandan da dolaşımdaki LDL'nin hücre içine alınmasını sağlayarak gerçekleşir. Karacigerde VLDL üretiminin statinler tarafından inhibe edilmesinin kolesterol sentezindeki düşme sebebiyle gerçekleştiği düşünülmektedir. Çünkü kolesterol VLDL' nin bir bileşenidir. Bu mekanizma muhtemelen statinlerin trigliserit düşürücü etkilerinden de sorumludur (Güleç, 2007).

HMG-Co A redüktazın katalitik bölgesindeki yapı ile günümüzde tanımlanan 7 farklı statin (mevastatin, simvastatin, fluvastatin, atorvastatin, cerivastatin, rosuvastatin ve pravastatin) kompleks oluşturabilir. Ancak statinlerin hepatik HMG-Co A redüktaz inhibisyon etkileri değişkenlik gösterir. Statinler kullanılan doza bağlı olarak LDL

kolesterolü %20' den %50' ye kadar düşürürler. Farklı statinlerin etkilerinin karşılaştırıldığı geniş çalışmalara göre statinlerin yaklaşık eş dozları 2.5 mg atorvastatin, 5 mg simvastatin, 15 mg lovastatin, 15 mg pravastatin, 40 mg fluvastatin şeklindedir. Ancak statinlerin doz cevap ilişkileri incelemeleri LDL kolesterolün düşürülme etkinliğinin lineer olmadığını göstermiştir (Aktürk, 2006). Statinlerin ana etki mekanizması LDL seviyesini düşürme olmasına karşın birçok biyolojik mekanizmayı da olumlu ve olumsuz etkilediği gösterilmiştir (David et al., 2000; Pahan, 2006; Fritz et al., 2011).

1.2.4. Statin Üretici Organizmalar

İlk statin, 1976 yılında Akira Endo adlı bilim adamının araştırmaları sonucunda *Penicilim citrinum*'dan elde edilmiş ve "mevastatin" olarak adlandırılmıştır (Endo, 1979). Madrid' te CIBE laboratuvarlarında tanımlanan *Aspergillus terreus* ve *Monascus ruber*' in (monakolin K) statin ürettiği belirlenmiş ve ilk lovastatin (mevinolin) olarak patentlenmiştir (Alberts et al., 1980). Statinin önemi yavaş yavaş ortaya çıkarken çeşitli tarama çalışmaları hız kazanmıştır. Yapılan bazı çalışmalarda bazı mikroorganizmaların statin ürettiği belirlenerek patenti alınmıştır (Çizelge 1.3)

Çizelge 1.3. Lovastatin üretimi için patent alınmış bazı üretim modelleri

Sekonder metabolit	**Mikroorganizma**	**Referans**
Statin	*Nocardia* sp.	Williamson, 1989
Schizostatin	*Schizophyllum commune*	Tanimoto et al., 1996
Pravastatin	*Streptomyces* sp. CJPV 975652	Lee et al., 2004
Wuxistatin	*Amycolatopsis* sp.	Zhuge et al., 2008

Lovastatin üretiminin endüstriyel süreci 1980 yılında *A. terreus* suşlarının kullanılmasıyla başlamıştır ("Mevacor", Merck). Sürecin gelişmesi, çeşitli karbon ve azot kaynakların etkisi, pH, oksijen ihtiyacı gibi farklı fermentasyon parametrelerinin analizini içerir. Metkinen grup (orjinal statin üreticisi), geliştirilmiş programlarda oluşturulmuş deney koşullarında *A. terreus* ATCC 20542 suşu ile lovastatin üretimini 7-

8 g/l arttırmıştır. Biocon (Bangolare, Hindistan) lovastatin üretimi için 2001 Haziran ayında oluşturulan FDA tarafından desteklenen bir şirkettir. Bu şirket lovastatin üretim sürecinde Plafractor (büyük ölçekli katı-matriks biyoreaktör) ile fermentasyon teknolojisini temel almıştır. Bu yeni biyoreaktör katı substrat ve batık kültür fermentasyonlarında avantajlara sahiptir ve ürün ekstraksiyon aşamasında sürecin problemlerini en aza indirgemiştir (Suryanarayan and Mazumdar, 2001). Fermentasyon teknolojisinin gelişmesiyle birlikte statin üretimini yapan mikroorganizmaların belirlenmesi de hız kazanmıştır. Yapılan çalışmalarda *Doratomyces*, *Eupenicillium, Gymnoascus, Hypomyces, Paecilomyces, Phoma, Trichoderma* (Samiee et al., 2003) ve *Pleurotus, Agaricus* (Gunde-Cimerman et al., 1993) 'un yanı sıra bazı aktinomisetlerin de statin ürettiği rapor edilmiştir (Srinu et al., 2010). *Monascus purpureus, M. ruber, M. pilosus, M. vitreus* ve *M. pubigerus'* un lovastatin üretici önemli organizmalar olduğu belirlenmiştir (Hajjaj et al., 2001; Chang et al., 2002; Miyake et al., 2006). *Monascus* türleri genellikle Uzak Doğu ülkelerinde "red koji" olarak bilinen geleneksel fermentasyonunda kullanılarak fermente gıda ürünü elde edilmektedir. *Monascus* türlerinin yanı sıra *Aspergillus* türlerinden *A. flavipes, A. fischeri, A. flavus, A. umbrosus, A. parasiticus ve Accremonium chrysogenum* 'un da lovastatin ürettiği bilinmektedir (Manzoni and Rollini, 2002; Ahmad, 2010).

Statinlerin keşfinden sonra yapılan araştırmalarda statinlere olan talebin artması ve statinlerin hiperkolesterolemik etkisinin dışındaki olumlu etkilerinin ortaya çıkmasıyla birlikte lovastatinlerin fungal sekonder metabolizmanın ara ve son ürünü veya biyotransformasyon sürecinin ürünü olarak geniş oranda eldesi amaçlanmıştır. Bu çalışmada yüksek miktarda lovastatin üreten yeni izolatlar belirleyebilmek amacı ile bazı makrofungusların lovastatin üretme potansiyelleri araştırılmıştır. Tarama sonunda lovastatin ürettiği belirlenen izolatlardan iki tanesinin yüksek lovastatin üretimini sağlamak için derin kültür ve katı faz fermentasyonlarında lovastatin üretimini etkileyen besiyeri içerikleri ve ortam koşullarının optimizasyonu konu alınmıştır.

2. MATERYAL VE METODLAR

2.1. Materyal

2.1.1. Test mikroorganizmaları

Bu çalışmada statin üretim potansiyelini araştırmak için kullanılacak "Agar plak difüzyon metodu", statine duyarlı test mikroorganizmalarının kullanılmasını zorunlu kılmaktadır. Bu amaçla çalışmada kullanılacak test organizmalarından *Candida albicans* ESOGÜ, Tıp Fakültesi, Mikrobiyoloji Anabilim Dalı'ndan, *Neurospora crassa* ise Prof. Dr. Nevin Keskin' den (Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü) temin edilmiştir.

2.1.2. Pozitif kontroller

Çalışmada statin ürettiği bilinen standart organizmalar, karşılaştırma materyali olarak kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan *Monascus purpureus* NRRL 1596, *Aspergillus terreus* NRRL 255 ve *Penicillium citrinum* NRRL 1841 suşları ARS Kültür Koleksiyonu'ndan (Peoria, IL. U.S), *Pleurotus ostreatus* HK 35 suşu ise Agro Mantar' dan (Denizli) temin edilmiştir.

2.1.3. Çalışılan makrofungus kültürleri

Bu çalışmada statin üretim potansiyeli açısından incelenmesi amacıyla, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde oluşturulan "Makrofungus Kültür Koleksiyonu"ndaki (OBCC) 136 adet saf kültür taramaya alınmıştır (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Statin üretimi açısından taramaya alınan makrofungus kültürleri

OBCC Kodu	Tür adı	**OBCC** Kodu	Tür adı
01	*Rhizopogon roseolus*	1002	*Leucoagaricus pudicus*
02	Tanımlanmamış izolat	1003	Tanımlanmamış izolat
03	*Ganoderma* sp.	1004	*Ganoderma carnosum*
04	*Suillus bovinus*	1005	*Suillus collitinus*
05	*Tricholoma equestre*	1006	*Trametes versicolor*
06	*Clavariadelphus truncatus*	1007	*Fomes fomentarius*
07	Tanımlanmamış izolat	1008	*Antrodia serialis*
08	*Lepista nuda*	1010	*Ganoderma applanatum*
09	*Polyporus arcularius*	1011	*Inonotus hispidus*
10	Tanımlanmamış izolat	1012	*Laetiporus sulphureus*
11	*Trametes hirsuta*	1013	Tanımlanmamış izolat
12	Tanımlanmamış izolat	1014	*Coprinus comatus*
13	*Schizophyllum commune*	1016	Tanımlanmamış izolat
14	*Gloeophyllum abietinum*	1017	*Phlebia tremellosa*
15	*Suillus luteus*	1018	*Rhizopogon roseolus*
16	Tanımlanmamış izolat	1019	*Pholiota* sp.
17	*Polyporus arcularius*	1020	*Suillus* sp.
18	*Gloeophyllum sepiarium*	1023	*Schizophyllum commune*
19	*Hypholoma fascicularia*	1024	*Schizophyllum commune*
20	Tanımlanmamış izolat	1025	*Schizophyllum commune*
21	Tanımlanmamış izolat	1026	*Inonotus hispidus*
22	*Suillus luteus*	1027	*Funalia trogii*
23	*Pycnoporus cinnabarius*	1028	*Coprinus comatus*
24	*Macrolepiota procera*	1029	*Ganoderma adspersum*
25	*Trametes versicolor*	1030	*Fomes fomentarius*
26	*Hypholoma* sp.	1031	*Pleurotus ostreatus*
27	Tanımlanmamış izolat	1032	Tanımlanmamış izolat
28	*Macrolepiota procera*	1033	Tanımlanmamış izolat
29	*Hypholoma fascicularia*	1035	*Fistulina hepatica*
30	*Polyporus arcularius*	1036	*Lentinus tigrinus*
31	*Polyporus arcularius*	1037	*Macrolepiota procera*
32	*Polyporus arcularius*	1038	Tanımlanmamış izolat
33	*Polyporus arcularius*	1039	*Leucoagaricus pudicus*
34	*Polyporus arcularius*	1040	*Laetiporus sulphureus*
35	*Hypholoma fasciculare*	1041	*Agaricus campestris*
36	Tanımlanmamış izolat	1043	Tanımlanmamış izolat
37	Tanımlanmamış izolat	1044	Tanımlanmamış izolat
38	Tanımlanmamış izolat	1045	*Inonotus hispidus*
1001	Tanımlanmamış izolat	1046	Tanımlanmamış izolat

Çizelge 2.1. Statin üretimi açısından taramaya alınan makrofungus kültürleri (devam)

OBCC Kodu	Tür adı	**OBCC** Kodu	Tür adı
1047	Tanımlanmamış izolat	5004	*Lentinus strigosus*
1501	*Suillus* sp.	5005	*Cerrena unicolor*
1502	*Cystoderma* sp.	5006	*Trametes pubescens*
1503	*Rhizopogon* sp.	5007	*Gloeophyllum sepiarium*
1504	Tanımlanmamış izolat	5008	*Ganoderma lucidum*
1505	Tanımlanmamış izolat	5009	*Inonotus hispidus*
2001	*Lenzites betulina*	5010	*Schizophyllum commune*
2002	Tanımlanmamış izolat	5011	Tanımlanmamış izolat
2501	Tanımlanmamış izolat	5012	*Trametes versicolor*
2502	*Stereum hirsutum*	5013	*Polyporus arcularius*
2503	*Omphalatus illudens*	5014	*Trametes hirsuta*
2504	Tanımlanmamış izolat	5015	*Paxillus involutus*
2505	*Suillus* sp.	5016	Tanımlanmamış izolat
2506	Tanımlanmamış izolat	5017	Tanımlanmamış izolat
2507	*Polyporus* sp.	5018	*Polyporus arcularius*
2508	*Rhizopogon luteolus*	5019	*Macrolepiota procera*
2509	*Suillus* sp.	5020	*Stereum hirsutum*
2510	Tanımlanmamış izolat	5021	*Crepidotus* sp.
2511	*Lactarius deliciosus*	5022	*Trametes versicolor*
2512	Tanımlanmamış izolat	5023	*Trametes versicolor*
2513	*Suillus* sp.	5024	*Hygrocybe pratensis*
2514	Tanımlanmamış izolat	5025	*Agaricus campestris*
2515	*Daedalea quercina*	5026	Tanımlanmamış izolat
3001	*Trametes versicolor*	5027	*Schizophyllum commune*
3002	*Tapinella panuoides*	5028	Tanımlanmamış izolat
3501	Tanımlanmamış izolat	5029	Tanımlanmamış izolat
5001	*Ganoderma carnosum*	5039	*Ganoderma* sp.
5002	*Trametes versicolor*	5040	*Tricholoma caligatum*
5003	*Polyporus squamosus*	ME 496	*Phanerochaete chrysosporium*

2.1.4. Besiyerleri

Çalışma süresince kullanılan ve aşağıda sıralanan besiyerleri, aksi belirtilmedikçe besiyeri içeriğinin distile suda çözülüp otoklavda 1.1 atmosfer basınç ve 121 ºC sıcaklıkta 15 dakika süre işlem görmesi ile steril edilerek kullanılmıştır.

Besiyeri 1: Patates Dekstroz Agar (PDA)

Ticari olarak alınan besiyerinden (Merck) 39.00 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 2: Sabouraud Dekstroz Agar (SDA)

Ticari olarak alınan besiyerinden (Merck) 28.00 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 3: Sabouraud % 2 Dekstroz Broth (SDB)

Ticari olarak alınan besiyerinden (Merck) 30.00 g/l oranında tartılarak hazırlanmıştır.

Besiyeri 4: PMP Medium

Malt Extract	10.00	g
Peptone	1.00	g
Potato Dextrose Broth	24.00	g
Distile su	1000	ml

Besiyeri 5: Yeast Laktoz Agar

Laktoz	120.00	g
Yeast	1.85	g
K_2HPO_4	2.00	g
$MgSO_4 . 7 H_2O$	0.52	g
NaCl	0.40	g
$Fe(NO_3)_3 . 9 H_2O$	2.00	mg
$ZnSO_4 . H_2O$	2.00	mg
Biotin	0.04	mg
Agar	15.00	g
İz element çözeltisi*	1.00	ml
Distile su	1000	ml
pH	5.5	

Sterilizasyon sonrası besiyerine gerektiği kadar filtre ile steril edilmiş biotin ve iz element çözeltisi ilave edilmiştir.

* İz element çözeltisi		
$Na_2B_4O_7 . 10H_2O$	10.00	mg
$MnCl_2 . 4H_2O$	5.00	mg
$CuSO_4 . 5H_2O$	25.00	mg
$Na_2MoO_4 . 2H_2O$	5.00	mg
Distile su	100	ml

2.1.5. Çözeltiler ve diğer kimyasal maddeler

Çözelti 1: Lovastatin Çözeltisi I

Biyolojik tayin çalışmalarında standart çözelti olarak ticari lovastatin tabletleri (Lipopres) kullanılmıştır. Tabletlerin laktonizasyonu Friedrich ve arkadaşları (1995) tarafından rapor edilen yöntem ile yapılmıştır. 20 mg tablet, 0.1 N NaOH çözeltisi ve etanol (1:1, v/v) karışımında çözülerek 50 °C sıcaklıkta, 20 dakika bekletilmiştir. Karışım soğuduktan sonra HCl ile nötralize edilmiştir.

Çözelti 2: Lovastatin Çözeltisi II

HPLC için standart çözelti olarak kullanılmıştır. 1 mg mevinolin' in (Sigma), 1 ml HPLC saflığındaki asetonitrilde çözülmesi ile hazırlanmıştır.

Çözelti 3: 1M NaOH Çözeltisi

4.1237 g NaOH (Merck), yeterli miktarda distile su ile çözüldükten sonra 100 ml' ye tamamlanması ile hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C 'de saklanmıştır.

Çözelti 4: 1M HCl Çözeltisi

8.2898 ml HCl (Merck, %37, d=1.19 kg/l), 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C 'de saklanmıştır.

Çözelti 5: 10M HCI Çözeltisi

82.898 ml HCl (Merck, %37, d=1.19 kg/l), 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C 'de saklanmıştır.

Çözelti 6: %10'luk HCl Çözeltisi

27.02 ml HCl (Merck, %37, d=1.19 kg/l), 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C 'de saklanmıştır.

Çözelti 7: Spor süspansiyonu hazırlama çözeltisi

%0.85 NaCl içeren %0.2 Tween-80 ile hazırlanmıştır.

Çözelti 8: MacFarland 0,5 Standart Çözeltisi

0.048 M $BaCl_2$ (% 1.17; w/v)‘ den 0.5 ml alınarak 99.5 ml 0.18 M H2SO4 (% 1; v/v) çözeltisine eklenmiştir. Oda sıcaklığında, karanlıkta muhafaza edilmiştir.

Çözelti 9: 5M H_2SO_4 Çözeltisi

27.32 ml H_2SO_4 (Merck, %98, d=1.83 kg/l), 100 ml’ ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C ’de saklanmıştır.

Çözelti 10: %5 $NaNO_2$ Çözeltisi

5 g $NaNO_2$ (Sigma - Aldrich), yeterli miktarda distile su ile çözüldükten sonra 100 ml’ ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Çözelti 11: %5 $KHSO_4$ Çözeltisi

5 g $KHSO_4$ (Sigma - Aldrich), yeterli miktarda distile su ile çözüldükten sonra 100 ml’ ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Çözelti 12: %12.5 $NH_4SO_3NH_2$ Çözeltisi

12.5 g $NH_4SO_3NH_2$ (Sigma - Aldrich), yeterli miktarda distile su ile çözüldükten sonra 100 ml’ ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Çözelti 13: %0.5 MBTH Çözeltisi

0.5 g 3-metil-benzotiazolinon-2-hidrozon (MBTH, Aldrich), yeterli miktarda distile su ile çözüldükten sonra 100 ml’ ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Çözelti 14: %5 FeCl2 Çözeltisi

5 g $FeCl_2$ (Merck), yeterli miktarda distile su ile çözüldükten sonra 100 ml’ ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanmıştır.

Çözelti 15: %0.1 Orto-fosforik asit Çözeltisi

HPLC saflığındaki %85’ lik orto-fosforik asitten (Merck) 0.117 ml alınarak 100 ml’ ye distile su ile tamamlanması ile hazırlanmıştır. Çözelti +4 °C’ de saklanmıştır.

Çözelti 16: Asetonitril : %0.1 Orto-fosforik asit Çözeltisi

HPLC saflığındaki 65 ml asetonitril, 35 ml %0.1 orto-fosforik asit ile karıştırılarak 100 ml asetonitril: %0.1 Orto-fosforik asit (65:35, v/v) çözeltisi hazırlanmıştır.

Çözelti 17: Metanol: distile su (50:50, v/v) Çözeltisi

50 ml metanol (Merck) alınarak 100 ml' ye distile su ile tamamlanarak hazırlanmıştır.

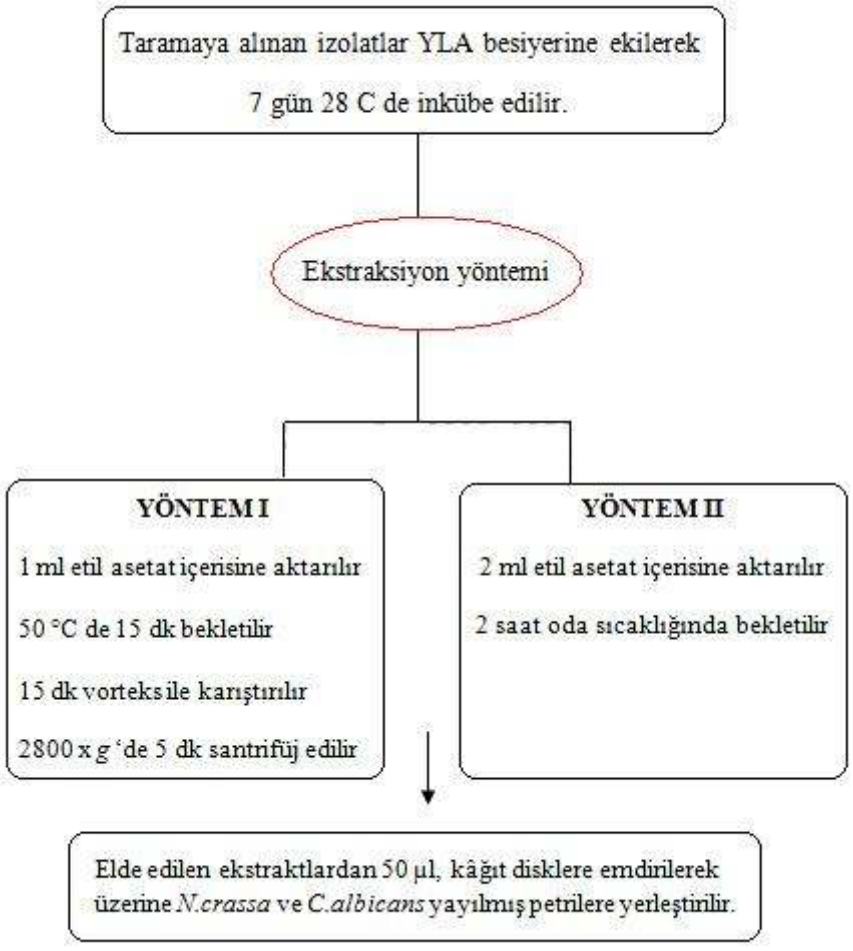
Çizelge 2.2. Optimizasyon çalışmasında kullanılan bazı besiyeri bileşenleri ve kullanım amaçları

Besiyeri Bileşeninin Adı	**Kullanım amacı**
Glikoz	Karbon Kaynağı
Laktoz	
Maltoz	
Gliserol	
Buğday kepeği	
Arpa	
Pirinç kavuzu	
Mısır	
Yulaf	
Yeast ekstrakt	Azot Kaynağı
Malt ekstrakt	
Pepton	
Amonyum sülfat	
NaCl	Mineral
Thiamin	Vitamin

2.2. Metodlar

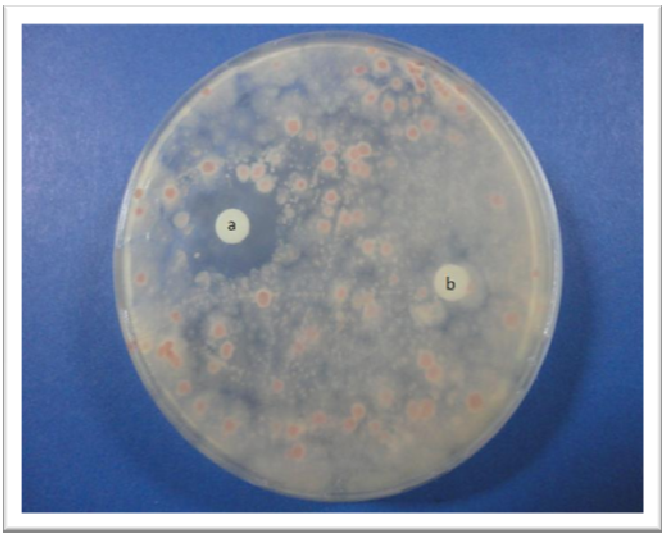
2.2.1. Statin üreticisi makrofungusların yarı kantitatif yöntem ile seçilmesi (Agar plak difüzyon metodu)

Statin ürettiği bilinen standart organizmalar, ekstraksiyon yöntemlerinde karşılaştırma materyali olarak kullanılmıştır. Bu amaçla kullanılan *Monascus purpureus* NRRL 1596, *Aspergillus terreus* NRRL 255, *Penicillium citrinum* NRRL 1841 ve *Pleurotus ostreatus* HK 35 statin üretimini indükleyen yeast laktoz agar (YLA) besiyerinde 7 gün 28 °C 'de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası Şekil 2.1' de görülen iki yöntemle statin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.1. Statin ekstraksiyonu ve biyotayininin genel akış şeması

Bu yöntemlerden yöntem I ekstraksiyon yöntemi olarak seçilerek taramaya alınan makrofungus kültürlerinden statin ekstraksiyonu bu yöntemle yapılmıştır. Yöntem I' de YLA besiyerinden 6 mm lik agar diskler çıkartılıp, 1 ml etil asetat (Merck) bulunan santrifüj tüplerine aktarılarak 50 °C' de 15 dakika bekletilmiştir. Agar diskler, 2 dakika aralıklarla 15 dakika vorteks ile karıştırıldıktan sonra 2800 x *g* 'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Yöntem II' de ise, YLA besiyerinden çıkarılan 6 mm lik agar diskler 2 ml etil asetat içeren santrifüj tüpüne aktarılarak içerisinde agar diskler küçük parçalara ayrılarak 2 saat oda sıcaklığında bekletilmiştir. Elde edilen ekstraktların test mikroorganizması kullanılarak biyotayini yapılmıştır (Şekil 2.2). Makrofungusların agar plaklarından elde edilen etil asetat ekstraktlarından 50 µl alınarak 6 mm çapındaki kağıt disklere emdirilmiştir. Negatif kontrol grubu için 50 µl etil asetat, pozitif kontrol grubu için 50 µl saf β-hidroksi asit miktarı bilinen çözelti emdirilen diskler hazırlanmıştır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. *Neurospora crassa* ile gözlenen pozitif ve negatif kontrol (a) β-hidroksi asit miktarı bilinen çözelti emdirilen disk; (b) etil asetat emdirilen disk

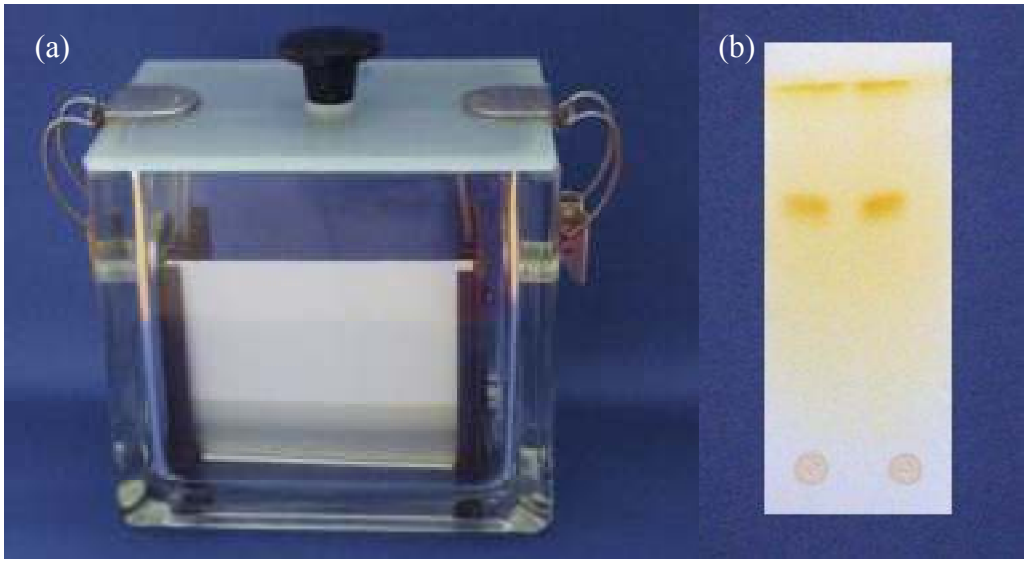
Bu yöntemde test organizması olarak kullanılan *Neurospora crassa*, PDA besiyerinde 10 gün 28 °C 'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda *N. crassa* sporları, steril % 0.85 NaCl içeren % 0.2 Tween-80 solüsyonuna toplanmıştır. Thoma lamında sayım yapılarak seyreltilen spor süspansiyonundan her ml sinde 0.3 - 0.5 x 10^8 spor olacak şekilde inokülasyon yapılmıştır. Diğer test organizması olan *Candida*

albicans, SDB besiyerinde 28 °C' de 24 saatlik inkübasyon sonrası Mc Farland 0.5 standardına göre steril ringer çözeltisine eklenerek her ml sinde 5 - 7 x 10^2 hücre olacak şekilde hazırlanmıştır. *N. crassa* ve *C. albicans*' ın hazırlanan süspansiyonlarından 100 µl alınarak PDA besiyeri bulunan 50 mm çapında petrilere aktarılarak drigalski spatülü yardımıyla yayılmıştır. *C. albicans* ve *N. crassa* sporu yayılmış petrilere, statin içerdiği öngörülen Whatman No:1 filtre kağıdı diskleri yerleştirildikten sonra petriler 28 °C' de 16-18 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon süresi sonunda disk etrafında inhibisyon zon oluşumunun varlığı taranmıştır.

Agar plak difüzyon metodu sonucu elde edilen zonların, inhibisyon zon çapı ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiştir. Standart eğri, β-hidroksi asit miktarı bilinen bir dizi konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilerden disklere 50' şer µl emdirilerek hazırlanmıştır. Taranan makrofungusların zon çaplarından standart eğri yardımıyla miktar tayini yapılmıştır (Kumar et al., 2000; Vilches Ferrón et al., 2005; Srinu et al., 2010; Cabral et al., 2010).

2.2.2. Statin üretiminin onaylanması

Elde edilen ekstraktlarda HMG-Co A redüktaz inhibitörü varlığını saptamak amacıyla ince tabaka kromatografisi (İTK) uygulanmıştır. Bu amaçla, analize hazırlanan örneklerden 30 µl' si, 0.3 mm kalınlığında 20 x 20 cm silica jel 60F254 tabakalara (Merck) emdirilmiştir. Referans olarak lovastatin çözeltisi kullanılmıştır. Çözücü olarak iki farklı hareketli faz (Hareketli faz I: Diklorametan ve etil asetat 70:30 (v/v), Hareketli faz II: Etil asetat, hekzan ve asetik asit 70:30:6 (v/v)) kullanılarak, tabakalar 15 dakika gelişmeye bırakılmıştır (Şekil 2.3). Bu işlem en az üç kez tekrarlanmıştır. Süre sonunda plakalar, 10 dakika bekletildikten sonra iyot gazına maruz bırakılmıştır. Tüm tabakalar UV ışığı (254 nm) altında gözlenmiştir. Rf değerlerinin karşılaştırılması için lovastatin standardı üç paralel halinde hazırlanmıştır (Samiee et al., 2003; Srinu et al., 2010; Jaivel ve Marimuthu 2010; Cabral et al., 2010).



Şekil 2.3. İnce tabaka kromotografisi (a), hareketli fazın tabaka üzerinde gelişimi; (b), lovastatin standardının iyot gazı ile muamelesi

Böylece yarı kantitatif yöntem ile daha yüksek oranda inhibisyon zonu veren makrofungus izolatları seçilmiş ve bu makrofungus izolatlarının neden olduğu inhibisyon zonunun statin üretiminden kaynaklandığı İTK ile doğrulanmıştır. Bu yöntemler ile diğer makrofungus izolatlarına göre daha yüksek statin üretimi sunan iki izolat (OBCC 1031 ve OBCC 2002) seçilmiş ve sonraki optimizasyon çalışmaları bu izolatlar ile sürdürülmüştür.

2.2.3. Statin üretiminin deneysel tasarım yöntemi ile optimizasyonu

Seçilen izolatlar tarafından yüksek miktarda statin üretimi sağlayan kültür tipini seçmek amacı ile derin kültür ve katı faz fermentasyonu olmak üzere iki farklı kültür yöntemi kullanılmıştır. Her iki kültür yönteminde de öncelikle lovastatin üretimini en fazla arttıran besiyeri bileşen ve koşulları belirlenmiştir. Bu amaçla Plackett-Burman deney tasarımı (PB) kullanılmıştır (Plackett ve Burman, 1946). Böylece her izolatın her kültür tipi için lovastatin üretimini arttırdığı en etkin bileşen ya da koşullar belirlenmiştir. Bu bileşen/koşulların izolat ve kültür tipine bağlı olarak değiştiği görülmüştür. Bu aşamadan sonra her izolat için lovastatin üretiminde en etkin olduğu belirlenen bileşen/koşulların en etkin seviyeleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla

izolata bağlı olarak cevap yüzey metodolojisi (Response Surface Method; RSM) ya da full faktöriyel deney tasarımı kullanılmıştır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. OBCC 1031 ve OBCC 2002 izolatları tarafından statin üretiminin optimizasyonu için kullanılan kültür tipleri ve istatistiksel tasarımlar

İzolat Kodu	Kültür tipi	Optimizasyon Tasarımları	
		Statin üretiminde etkili olan değişkenin seçilmesi	Etkin değişkenin statin üretimini arttıran düzeyinin belirlenmesi
OBCC 2002	Katı faz fermentasyonu	Plackett – Burman deney Tasarımı	Full faktöriyel deney tasarımı
OBCC 1031		Plackett – Burman deney Tasarımı	Box-Behnken deney tasarımı
OBCC 2002	Derin kültür fermentasyonu	Plackett – Burman deney Tasarımı	Box-Behnken deney tasarımı
OBCC 1031		Plackett – Burman deney Tasarımı	Box-Behnken deney tasarımı

2.2.3.1. Lovastatin üretiminde etkin besiyeri bileşen/koşullarının belirlenmesi

Lovastatin üretiminde en etkin besiyeri bileşen/koşulları Plackett-Burman deney tasarımı yöntemiyle belirlenmiştir. Plackett–Burman Deney Tasarımı, lovastatin üretimi üzerine etkiye sahip olması olası besinsel ve çevresel değişkenler arasından üretimi en fazla arttıran değişken(ler)i seçmek amacı ile gerçekleştirilmiştir.

Seçilen izolatların (OBCC 2002 ve OBCC 1031) lovastatin üretimini arttıran değişkenlerin belirlenmesi için Plackett-Burman (PB) metoduyla tasarlanmış besiyerleri kullanılmıştır. Bu kapsamda öncelikle her kültür tipi için statin üretimine etkisi olup olmadığı araştırılan 11 farklı değişken belirlenmiştir. Besiyerinde kullanılan değişkenlerin yüksek miktarı (+1), düşük miktarı ise (-1) olarak ifade edilmiştir. Bu 11 farklı değişken ile her iki kültür tipi için Çizelge 2.4' te görülen tasarım kullanılarak 12 farklı besiyeri hazırlanmıştır.

Çizelge 2.4. PB yaklaşımı ile 11 farklı besiyeri içeriği ile 12 farklı besiyerinin tasarımı

Değişken / Besiyeri	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1

Katı faz fermentasyonunda kullanılan değişkenler ve değişkenlerin araştırılan düşük ve yüksek düzeyleri Çizelge 2.5' de sunulmuştur. Katı substrat olarak buğday kepeği, arpa, pirinç kavuzu, mısır ve yulaf kullanılmıştır. Tüm katı substratlar öğütülüp eleklerden geçirilerek iki farklı partikül boyutuna (P_0: 0.6-1 mm; P_1: 1-3 mm) getirilmiştir. Katı substratlar, 60 °C' de 24 saat kurutularak tuttukları nem miktarı göz önüne alınarak tartılmıştır. Deneysel tasarım ile oluşturulan her besiyeri cam petrilerde (120 x 20 mm) en az 5 g substrat içerecek şekilde ayarlanmıştır. PB tasarımına göre bazı besiyerlerinde nem içeriğine mineral madde çözeltisinden 1 ml eklenmiştir. Hazırlanan katı besiyerlerine ilave karbon (laktoz) ve azot (yeast ekstrakt ya da malt ekstrakt) kaynakları eklenmiştir. Laktoz, besiyerinin toplam kuru ağırlığının % 3 (w/w) konsantrasyonunda, yeast ekstakt ya da malt ekstrakt ise besiyerinin toplam kuru ağırlığının % 1 (w/w) konsantrasyonunda ilave edilmiştir. Mineral tuz çözeltisi, $MgSO4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ 3.4 mg/l, NaCl 0.5 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 mg/l ve $MnSO_4$ 1.6 mg/l kullanılarak hazırlanmıştır.

Çizelge 2.5. Katı faz fermentasyonunda kullanılan değişkenler ve düzeyleri

Değişken kodu	Değişkenler		Düşük değer (-1)	Yüksek Değer (+1)
X1	Katı substrat (g)	Buğday kepeği	0	5
X2		Arpa	0	5
X3		Pirinç kavuzu	0	5
X4		Mısır	0	5
X5		Yulaf	0	5
X6	Mineral tuz çözeltisi (ml)		0	1
X7	İlave karbon kaynağı (%)	Laktoz	0	3
X8	İlave azot kaynağı (%)	Yeast ekstrakt	0	1
X9		Malt ekstrakt	0	1
X10	Partikül boyutu (mm)		0.6 - 1	1 - 3
X11	Dummy			

Hazırlanan besiyerleri distile su (dH_2O) ile toplam nem % 70 olacak şekilde nemlendirilmiştir. İçerisinde PB tasarımına göre ayarlanmış besiyerleri bulunan petriler kurutma kağıdı ile sarıldıktan sonra 121 °C' de ve 1.1 atm. basınçta 40 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

Çizelge 2.6. Derin kültür fermentasyonunda kullanılan değişkenler ve düzeyleri

Değişken kodu	Değişkenler		Düşük değer	Yüksek değer
X1	Karbon kaynağı (%)	Laktoz	0	3
X2		Glikoz	0	3
X3		Gliserol	0	3
X4		Maltoz	0	3
X5	Azot kaynağı (%)	Yeast ekstrakt	1	3
X6		Malt ekstrakt	1	3
X7		Pepton	1	3
X8		Amonyum sülfat	1	3
X9	Mineral (g/l)	NaCl	0.1	0.4
X10	Vitamin (µg/l)	Tiamin	0	1000
X11	Karıştırma (rpm)		0	200

Seçilen izolatların (OBCC 2002 ve OBCC 1031) statin üretimi derin kültür fermentasyonu için de Çizelge 2.5' de gösterilen tasarım uygulanmıştır Çizelge 2.6'

deki değişkenler ve oranları kullanılarak Plackett-Burman tasarımı ile oluşturulan besiyeri içerikleri 250 ml' lik erlenlere 100 ml aktarılmıştır. Sterilizasyondan önce besiyerlerinin pH' sı 1 N HCl ve 1 N NaOH kullanılarak 6.0' ya ayarlanmıştır. Erlenlerin ağzı pamuk tıpa, tıpanın üzeri de alüminyum folyo ile kaplanmıştır. Bu şekilde hazırlanan besiyeri 121 °C'de ve 1.1 atm. basınçta 15 dakika süre ile otoklavda steril edilmiştir.

Her iki izolatın inokülant hazırlığı için, PDA besiyerinde büyütülen izolatlardan 5 adet misel diski PMP besiyerlerine aktarılarak 4 gün 28 °C' de 100 rpm çalkalamalı etüvde inkübe edilerek makrofungus misellerinin gelişimi sağlanmıştır. Daha sonra steril kabinde besiyeri süzülerek ve steril dH_2O ile miseller yıkanarak toplam hacim steril dH_2O ile 100 ml' ye ayarlanır. Elde edilen hücre süspansiyonu steril koşullarda homojenizatör (Heidolph SilentCrusher M) ile homojenize edilmiştir. Elde edilen inokülant, petrilerde bulunan katı besi ortamları üzerine % 4 (v/w) oranında inoküle edilmiştir. İnokulasyon esnasında inokülantın petrinin her yerine homojen biçimde yayılması sağlanmıştır. Bu yolla hazırlanan kültürler, PB tasarımına göre derin kültür fermentasyonu ve katı faz fermentasyonu tipinde 28 °C' de 6 gün inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda her besiyeri bileşiminden elde edilen lovastatin değerleri Statistica 8 paket programı ile analiz edilerek lovastatin üretimi üzerine en etkili olan bağımsız değişkenler belirlenmiştir. Plackett-Burman tasarımı ile bağımsız değişkenlerin lovastatin üretiminde etkili olanları belirlendikten sonra, cevap yüzey metodolojisi ile lovastatin üretimi için bu değişkenlerin optimal seviyeleri belirlenmiştir.

2.2.3.2.Lovastatin üretiminde etkin besiyeri bileşen/koşul seviyelerinin belirlenmesi

Lovastatin üretiminde etkin besiyeri bileşen/koşul seviyelerinin belirlenmesinde cevap yüzey metodu kullanılmıştır. Bu metoda göre önemli bulunan 2 değişkenin seviyelerini belirlemede full faktöriyel, 3 değişkenin seviyelerini belirlemede ise Box-Behnken deney tasarımı kullanılmaktadır. Bu çalışmada OBCC 2002 izolatının katı faz fermentasyonunda PB metodu ile 2 bağımsız değişken seçilmiş olup, bu değişkenlerin etkisi full faktöriyel deney tasarımı ile araştırılmıştır. Bu değişkenler için +1 (yüksek), 0

(orta), -1 (düşük) olmak üzere 3 düzey test edilmiştir (Çizelge 2.7). Bu şekilde farklı kombinasyon ve miktarda besiyerleri hazırlanmıştır (Çizelge 2.8).

Çizelge 2.7. Full faktöriyel deney tasarımında kullanılan oranlar (SSF)

Değişken	Düzey		
	-1	0	+1
(X_2) Arpa (g)	2	5	8
(X_{10}) Partikül Boyutu (mm)	0.5 - 1	1 - 2	2 - 4

Çizelge 2.8. Full faktöriyel deney tasarımı ile oluşturulan besiyerleri (SSF)

Besiyeri	X_2	X_{10}
	Arpa (g)	Partikül Boyutu (mm)
1	8	2 - 4
2	8	0.5 - 1
3	8	1 - 2
4	5	2 - 4
5	5	0.5 - 1
6	5	1 - 2
7	2	2 - 4
8	2	0.5 - 1
9	2	1 - 2

Full faktöriyel deney tasarımı ile oluşturulan besiyerleri distile su (dH_2O) ile toplam nem %70 olacak şekilde nemlendirilmiştir. Full faköteriyel tasarıma göre hazırlanan besiyerleri PB' da yapıldığı gibi steril edilerek izolat OBCC 2002' nin inokülasyonu sağlanmıştır. İnkübasyon sonunda lovastatin ekstraksiyonu yapılarak üretilen miktarlar hesaplanmış ve Statistica 8 paket programı yardımıyla değişkenlerin etkileri belirlenmiştir.

İzolat OBCC 2002 için derin kültür ile fermentasyonunda Box-Behnken tasarımı ile 3 değişken ve +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere 3 seviye test edilmiştir. Deneysel tasarımda kullanılan bağımsız değişkenler ve oranları, oluşturulan besiyerleri Çizelge 2.9 ve Çizelge 2.10' da sunulmuştur.

Çizelge 2.9. OBCC 2002 izolatı için Box-Behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri (SmF)

Değişken	Düzey		
	-1	0	+1
(X_2) Glikoz (g/L)	1	3	5
(X_7) Pepton (%)	0	0,5	1
(X_{11}) Karıştırma hızı (rpm)	0	100	200

Çizelge 2.10. OBCC 2002 izolatı için Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan besiyerleri (SmF)

Besiyeri	X_2	X_7	X_{11}
	Glikoz (g/L)	Pepton (%)	Karıştırma hızı (rpm)
1	3	1	200
2	3	0.5	100
3	1	0.5	0
4	3	0.5	100
5	1	0	100
6	3	0	0
7	3	0.5	100
8	3	1	0
9	5	1	100
10	1	1	100
11	3	0.5	100
12	5	0.5	200
13	5	0.5	0
14	1	0.5	200
15	3	0	200
16	5	0	100
17	3	0.5	100

İzolat OBCC 1031 içinse, her iki kültür tipi için de Box-Behnken tasarımı ile 3 değişken ve +1 (yüksek), 0 (orta), -1 (düşük) olmak üzere 3 seviye test edilmiştir. Besiyeri tasarımında kullanılan değişkenler katı faz kültür sistemi için Çizelge 2.11 ve Çizelge 2.12' de, derin kültür sistemi için ise Çizelge 2.13 ve Çizelge 2.14' de sunulmuştur.

Çizelge 2.11. OBCC 1031 izolatı için katı faz kültür sisteminde (SSF) Box-Behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri

Değişken	Düzey		
	-1	0	+1
(X_2) Arpa (g)	2	5	8
(X_8) Yeast ekstrakt (%)	0	0.5	1
(X_{10}) Partikül Boyutu (mm)	0.5 - 1	1 - 2	2 - 4

Çizelge 2.12. OBCC 1031 izolatı için katı faz kültür sisteminde (SSF) Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan besiyerleri

Besiyeri	X_2	X_8	X_{10}
	Arpa (g)	Yeast ekstrakt (%)	Partikül Boyutu (mm)
1	5	1	2 - 4
2	5	0.5	1 - 2
3	2	0.5	0.5 - 1
4	5	0.5	1 – 2
5	2	0	1 - 2
6	5	0	0.5 - 1
7	5	0.5	1 - 2
8	5	1	0.5 - 1
9	8	1	1 - 2
10	2	1	1 - 2
11	5	0.5	1 - 2
12	8	0.5	2 - 4
13	8	0.5	0.5 - 1
14	2	0.5	2 - 4
15	5	0	2 - 4
16	8	0	1 – 2
17	5	0.5	1 - 2

Çizelge 2.13. OBCC 1031 izolatı için derin kültür sisteminde (SmF) Box-Behnken tasarımında kullanılan değişkenler ve düzeyleri

Değişken	Düzey		
	-1	0	+1
(X_2) Glikoz (g/L)	1	3	5
(X_5) Yeast ekstrakt (%)	0	0.5	1
(X_{11}) Karıştırma hızı (rpm)	0	100	200

Çizelge 2.14. OBCC 1031 izolatı için derin kültür sisteminde (SmF) Box-Behnken tasarımı ile oluşturulan besiyerleri

Besiyeri	X_2	X_5	X_{11}
	Glikoz (g/L)	Yeast ekstrakt (%)	Karıştırma hızı (rpm)
1	3	1	200
2	3	0.5	100
3	1	0.5	0
4	3	0.5	100
5	1	0	100
6	3	0	0
7	3	0.5	100
8	3	1	0
9	5	1	100
10	1	1	100
11	3	0.5	100
12	5	0.5	200
13	5	0.5	0
14	1	0.5	200
15	3	0	200
16	5	0	100
17	3	0.5	100

Cevap yüzey metodolojisinden Box-Behnken deney tasarımı ile oluşturulan besiyerleri Plackett-Burman deney tasarımında yapıldığı gibi steril edilerek izolatların inokülasyonu yapılmıştır.

Her iki izolatın optimizasyondan önce üretilen lovastatin miktarı, katı faz fermentasyonu için %70 nemlendirilmiş buğday kepeği, derin kültür fermentasyonu için de yeast laktoz agarın, agar eklemeden sıvı besiyeri olarak kullanılmasıyla araştırılmıştır.

2.2.3.3. Analitik yöntemler

2.2.3.3.1. Statinin kantitatif tayini

2.2.3.3.1.1. Ekstraksiyon

Katı faz fermentasyonundan sonra üretilen statinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Fermentasyon besiyeri iyice karıştırıldıktan sonra 1 gram alınarak 5 ml etil asetatla süspanse edilmiştir. 70 °C ve 180 rpm' de 1.5 saat çalkalanmıştır. Karışım 3.000×g' de 8 dakika santrifüj edilmiştir. Süpernatant (1 ml) ayrı bir santrifüj tüpüne toplanmıştır. 80 °C' de vakum uygulamaksızın konsantre edilerek 1 ml asetonitrilde çözdürülmüştür. Elde edilen statin çözeltisi 0.45-µm filtreden geçirilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) için hazır hale getirilmiştir (Sayyad et al., 2007; Panda et al., 2008; 2009).

Sıvı faz fermentasyonundan sonra da benzer olarak üretilen statinin ekstraksiyonu gerçekleştirilmiştir. Fermente besiyeri sıvısının misellerden ayrılması için daha önce kuru ağırlığı tartılmış filtre kağıtları (Whatman No. 1) ile süzülmüştür. Elde edilen fermente sıvısının pH' sı %10' luk HCl ile 3.0' e ayarlanmıştır. Asidik hale getirilen sıvı eşit hacimde etil asetat ile 2 saat çalkalanarak ekstraksiyon yapılmıştır. Elde edilen ekstrakt 1500 x g' de 15 dakika santrifüj edildikten sonra organik faz (süpernatant) ayrı bir santrifüj tüpüne toplanmıştır. Süpernatant 80 °C' de vakum uygulamaksızın konsantre edilerek 1 ml asetonitrilde çözülmüştür. Elde edilen statin çözeltisi 0.45-µm filtreden geçirilerek yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) için hazır hale getirilmiştir (Samiee et al., 2003; Jaivel and Marimuthu 2010).

2.2.3.3.1.2. Tayin

Fungal ekstraktlarda statin varlığı ve miktar tayini için yüksek basınçlı sıvı kromotografisi (HPLC - High Pressure Liquid Chromatography) kullanılmıştır. Bu amaçla ikili gradiyent sistemi oluşturulmuştur. Kullanılan HPLC parametreleri ve özellikleri Çizelge 2.15' te gösterilmiştir.

Çizelge 2.15. Kullanılan HPLC cihazı özellikleri ve koşulları

<table>
<tr><td rowspan="6"></td><td>HPLC cihazı</td><td>SHIMADZU SPD 20A prominence</td></tr>
<tr><td>Kontrol Ünitesi</td><td>SCL-10AVP</td></tr>
<tr><td>Degaz Ünitesi</td><td>DGU-14A</td></tr>
<tr><td>Pompa Ünitesi</td><td>LC-10ADVP</td></tr>
<tr><td>Manuel Enjektör</td><td>7725i</td></tr>
<tr><td>Yazılım Programı</td><td>CLASS-VP 6.1</td></tr>
<tr><td>Dedeksiyon</td><td colspan="2">UV dedektör (238 nm)</td></tr>
<tr><td>Kolon özelliği</td><td colspan="2">250 mm x 4.6 mm C18 kolon (ters faz)
5 µm partikül boyutu</td></tr>
<tr><td>Akış hızı</td><td colspan="2">1.5 ml/min</td></tr>
<tr><td>Kolon sıcaklığı</td><td colspan="2">45 °C</td></tr>
<tr><td>Enjeksiyon hacmi</td><td colspan="2">20 µl</td></tr>
<tr><td>Hareketli faz</td><td colspan="2">Asetonitril : %0.1 fosforik asit çözeltisi (65:35, v/v)</td></tr>
</table>

Çoğu statinler pH' a bağlı olarak iki farklı forma sahiptirler. Alkali koşullarda β-hidroksi asit formunda iken asidik koşullarda lakton formunda bulunurlar. Lovastatinin miktar tayini HPLC' de yapılırken β-hidroksi asit formu ile analiz yapılmıştır. Standart lovastatin çözeltisi II, açık β-hidroksi asit formu stabil olmadığından taze hazırlanmıştır. Hareketli faz ve örnekler sisteme verilmeden önce degaz edilmiştir. HPLC cihazına örnekler asetonitrile dayanıklı 0.45 µm filtreden geçirildikten sonra enjekte edilmiştir. Her bir analiz için üç tekrar yapılmıştır. Sistem, metanol:su (50:50; v/v) çözeltisi ile temizlenmiştir. Elde edilen veriler kromotogram olarak kaydedilerek, piklerin alan hesapları sonucunda lovastatin miktar tayini yapılmıştır.

2.2.3.3.2. Total biyokütle tayini

Katı faz fermentasyonunda total biyokütle, spektrofotometrik bir yöntem olan glukozamin tayin yöntemiyle belirlenmiştir (Desgranges et al., 1991). Homojen olacak şekilde karıştırılmış fermente besiyerinden 1 gram alınarak dH_2O ile yıkanmıştır. Yıkanan 1 gram substrat-hücre karışımı, 50 ml 5 M H_2SO_4 ile 15 dk çalkalandıktan sonra 5000 rpm' de 10 dk santrifüj edilmiştir. Tüplerin içindeki asit dökülerek pellet dH_2O ile 2 kez yıkanarak, 10 ml 10 M HCI ile 20 °C' de 16 saat bekletilmiştir. Sonra toplam hacim 50 ml olması için üzerine 40 ml dH_2O eklenerek 130 °C' de 2 saat otoklavda bekletilerek hidroliz tamamlanmıştır. Soğuyan hidrolizatın önce 10 M NaOH ile pH metrenin ölçebileceği değere getirildikten sonra pH' sı 0.5 M NaOH ile 7' ye ayarlanmıştır. Elde edilen süspansiyona eşit hacimde (1.5 ml) % 5 $NaNO_2$ ve % 5 $KHSO_4$ eklenerek karışım 15 dk çalkalanmıştır. 1500 g' de, 2 dk, 4 °C' de santrifüj edildikten sonra elde edilen supernatanttan 1.5 ml' lik 2 örnek alınmıştır. Bunların her birine 0.5 ml % 12.5 $NH_4SO_3NH_2$ eklenerek 5 dk çalkalanmıştır. Üzerlerine 0.5 ml % 0.5 MBTH eklenerek 3 dk kaynar su banyosunda bekletilmiştir. Soğuduktan sonra 0.5 ml % 5 $FeCl_2$ eklenerek 30 dk bekletilmiştir. 30 dk sonunda 650 nm' de kuvars küvette optik yoğunluk okutulmuştur. Ticari olarak satın alınan glukozamin-HCl standart, distile su kör olarak kullanılmıştır. Glukozamin değeri µg glukozamin/mg kuru ağırlık olarak ifade edilmiştir Derin kültür fermentasyonunda ise miseller filtrasyon sonucunda toplanarak 70 °C' de 24 saat kurutularak tartılmıştır.

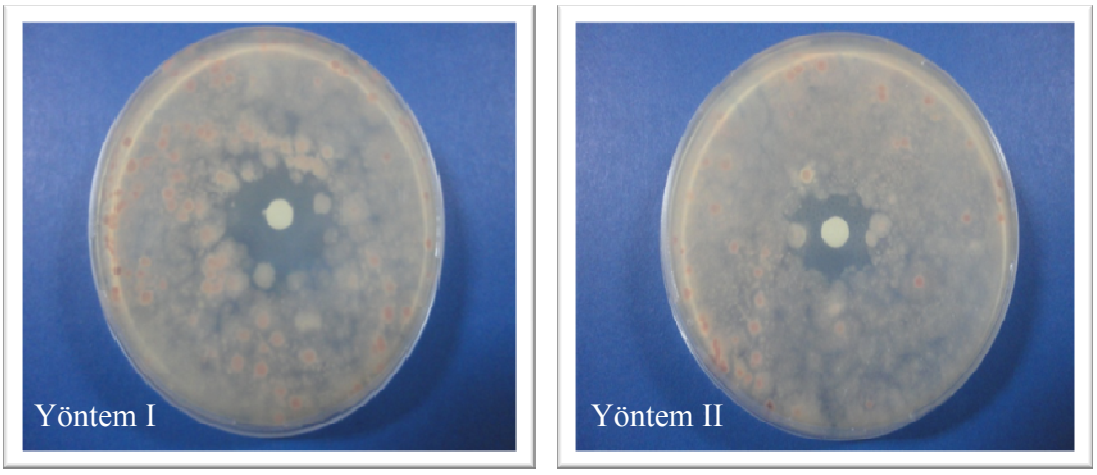
2.2.3.3.3. Son pH' nın belirlenmesi

Ekstraksiyon sonucunda elde edilen filtratlarda bulunan lovastatinin doğru miktar tayini yapılabilmesi için filtratlar asidikleştirilmelidir. Bu amaçla filtratların son pH'sı belirlenmiştir. Katı faz fermentasyonundan elde edilen fermente karışımdan 1 gram alınarak 10 ml dH_2O ile 1 saat çalkalanarak sulu süspanse elde edilmiştir. Süspanse filtre kağıdından süzülerek pH metre (Eutech Ion 510) ile filtratın pH'sı ölçülmüştür. Derin kültür yönteminde ise doğrudan süzülen filtratın pH' sı ölçülmüştür.

3. BULGULAR

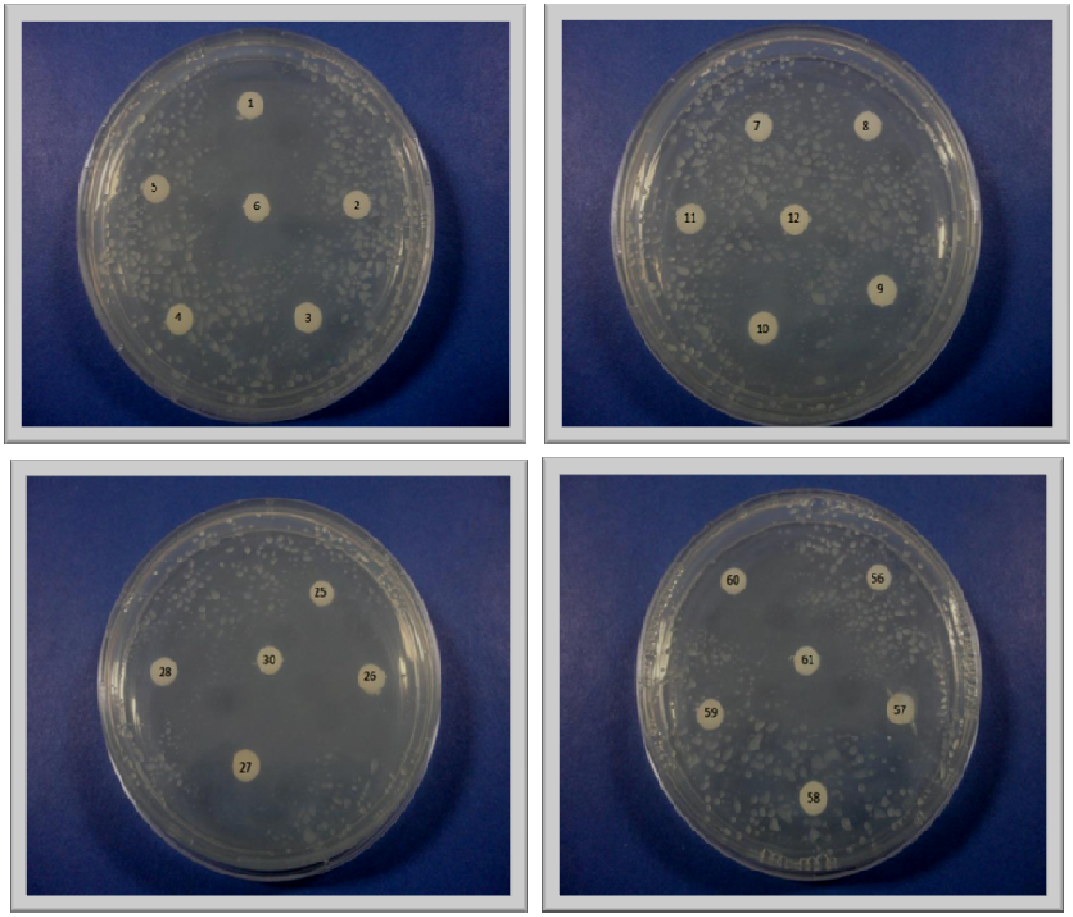
3.1. Statin üreticisi makrofungusların yarı kantitatif yöntem ile seçilmesi

Statin ürettiği bilinen 4 fungus izolatının (*Monascus purpureus* NRRL 1596, *Aspergillus terreus* NRRL 255, *Penicillium citrinum* NRRL 1842 ve *Pleurotus ostreatus* HK 35) YLA' da statin üretimi sağlanarak inkübasyon sonunda iki farklı ekstraksiyon yöntemi (Yöntem I ve Yöntem II) karşılaştırılmıştır (Şekil 3.1). Bu yöntemlerin uygulanması sonucu elde edilen ekstraktlardaki olası statin varlığı agar plak difüzyon yöntemi kullanılarak kalitatif ve yarı kantitatif olarak belirlenmiştir (Kumar et al., 2000; Vilches Ferrón et al., 2005). Elde edilen kalitatif ve yarı kantitatif verilere göre ekstraksiyon yöntemi olarak daha verimli bir yöntem olduğu belirlenen Yöntem I seçilmiştir.

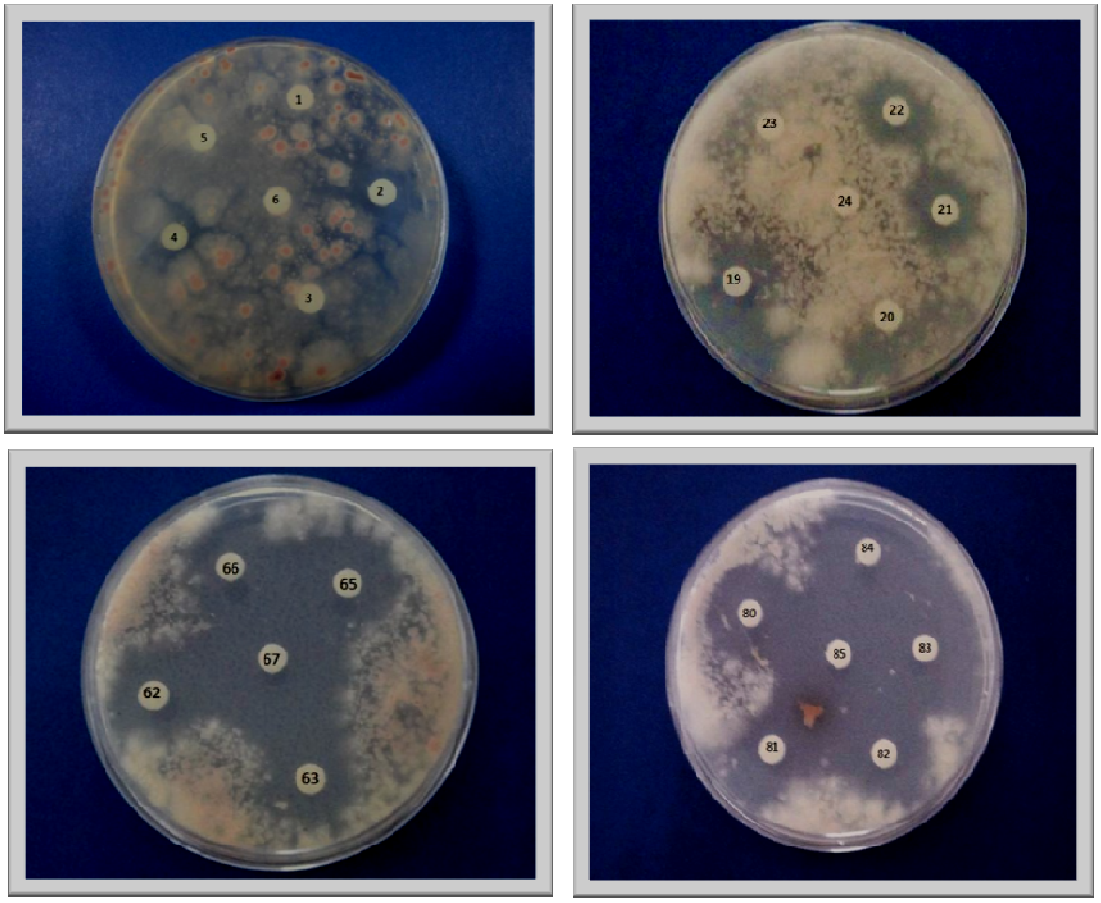


Şekil 3.1. Yöntem I ve Yöntem II ekstraktlarındaki olası statinin *N.crassa* inhibisyon zonları

Taramaya alınan makrofungusların lovastatin üretim potansiyellerinin belirlenmesi amacıyla öncelikle YLA besiyerine ekilerek olası statin üretiminin indüklenmesi sağlanmıştır. İnkübasyon sonucunda ekstraksiyon yöntemi olarak verimli bulunan Yöntem I kullanılmıştır. Zon oluşumu görülen makrofungus kültürlerinin ekstraktları statin üretimi açısından pozitif olarak değerlendirilmiştir (Şekil 3.2, Şekil 3.3). Oluşan zon çapları kumpas ile ölçülerek mm cinsinden kaydedilmiştir.

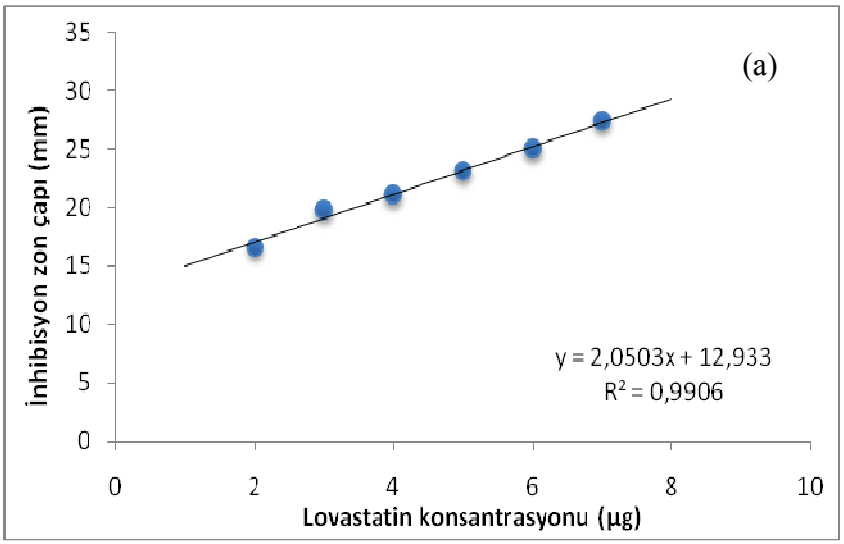


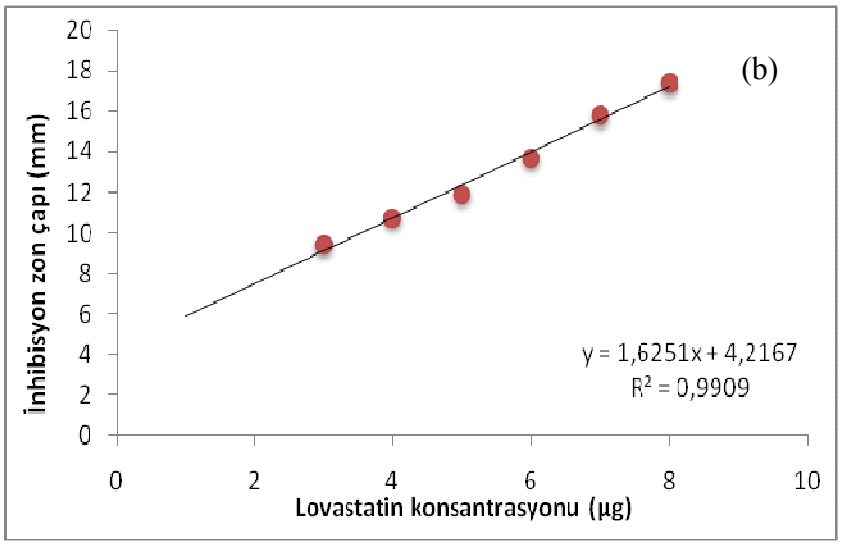
Şekil 3.2. Elde edilen bazı ekstraktların *C.albicans* inhibisyon zonları. Sırasıyla zon oluşturan makrofunguslar; (1) OBCC 5008, (3) OBCC 23, (6) OBCC 2002, (8) OBCC 03, (9) Pozitif kontrol (0.5 mg/ml), (10) OBCC 1031, (25) OBCC 2001, (26) NRRL 255, (27) NRRL 1596, (28) NRRL 1841, (30) OBCC 5022, (57) HK 25, (60) OBCC 06, (61) ME496



Şekil 3.3. Elde edilen bazı ekstraktların *N.crassa* inhibisyon zonları. Sırasıyla zon oluşturan makrofunguslar; (2) OBCC 03, (19) OBCC 5022 , (21) Pozitif kontrol (0.5 mg/ml), (22) OBCC 5008 , (62) OBCC 2001, (63) OBCC 5008, (65) OBCC 2002, (66) ME496, (67) OBCC 1031, (80) NRRL 1596, (81) HK 25, (82) OBCC 06, (83) NRRL 255, (84) NRRL 1841, (85) OBCC 23

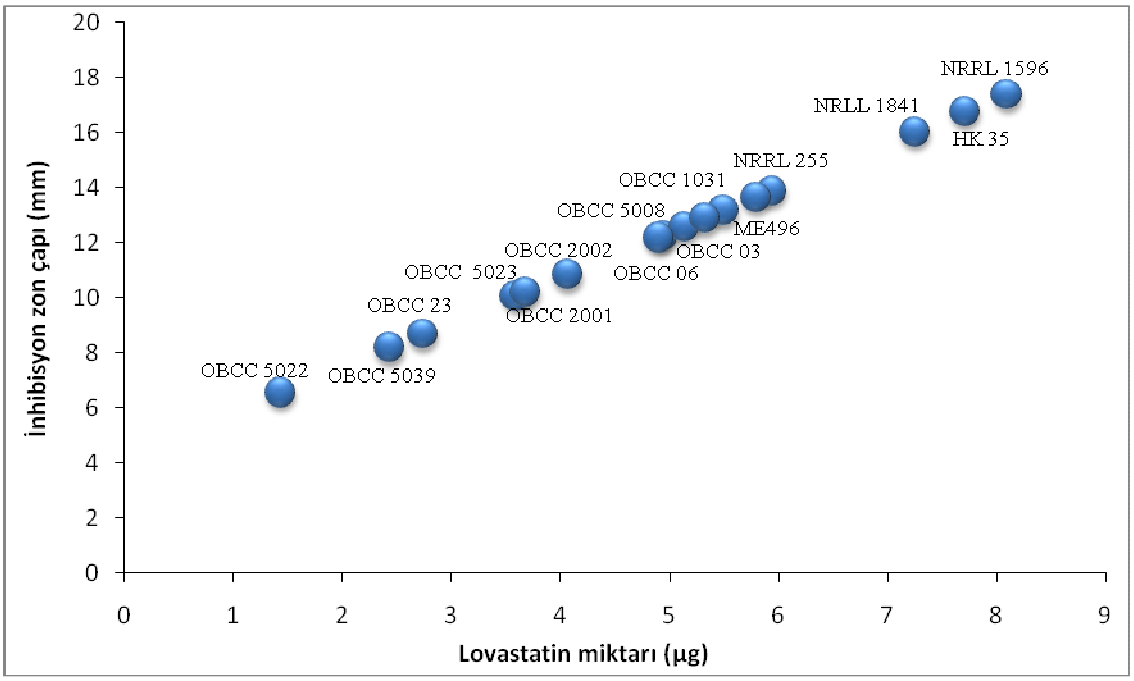
Yarı kantitatif tayin için farklı derişimlerde hazırlanan lovastatin standartlarının zon çapları aynı yöntemle belirlenmiş ve derişime karşı bu ölçüm sonuçları grafiğe geçirilerek bir standart eğri elde edilmiştir (Şekil 3.4).



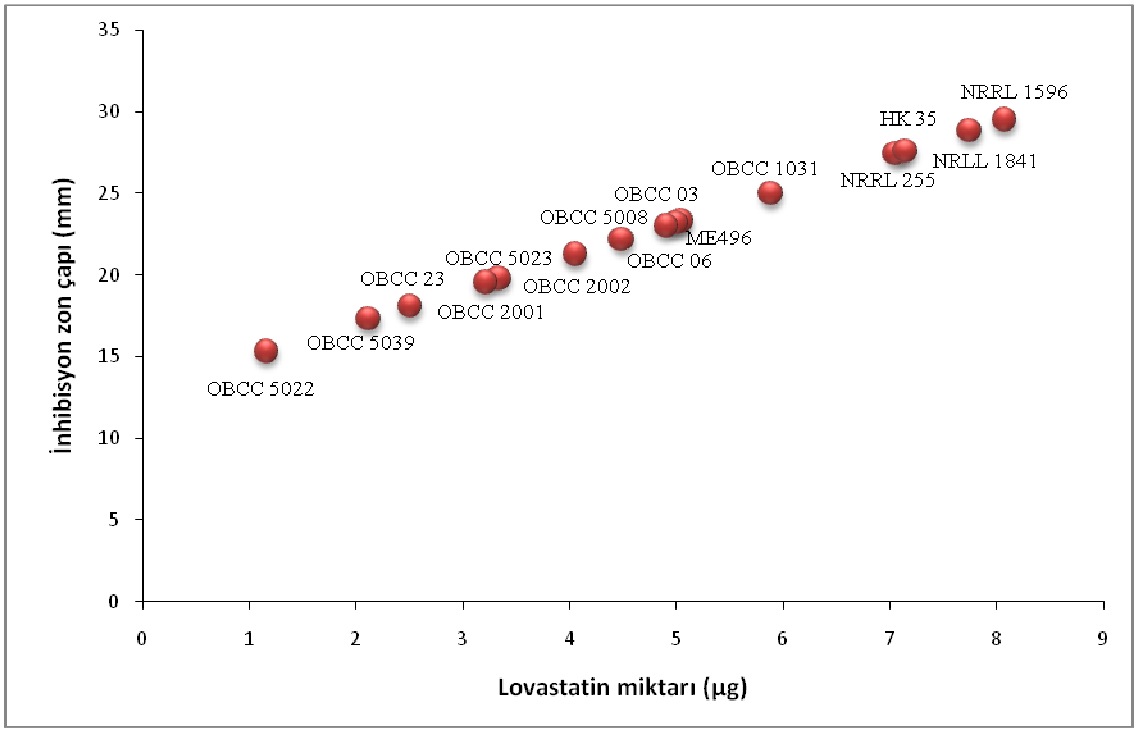


Şekil 3.4. Lovastatin standartlarının (a) *C.albicans* ve (b) *N. crassa* inhibisyonu ile oluşturulan standart eğrileri

Oluşturulan standart eğrinin formülleri kullanılarak ölçülen zon çapları ile olası lovastatin miktarı hesaplanmıştır. Şekil 3.5 ve Şekil 3.6' da agar difüzyon plak yönteminde elde edilen zonlara göre hesaplanan olası lovastatin miktarları standart eğri üzerinde verilmiştir. Taranan izolatların biyotayinin de kullanılan *C. albicans* inhibisyon zon çapları, *N. crassa*' nın inhibisyon zon çaplarından daha küçük olduğu görülmüştür. Bu nedenle hesaplanan olası lovastatin miktarları farklılık göstermektedir ancak izolatların arasındaki sıralama değişmemiştir.



Şekil 3.5. C.*albicans* inhibisyonu sonucu pozitif sonuç veren izolatların olası lovastatin miktarları



Şekil 3.6. *N.crassa* inhibisyonu sonucu pozitif sonuç veren izolatların olası lovastatin miktarları

Taranan 136 makrofungus izolatı arasından olası lovastatin üretimi potansiyeline sahip pozitif izolatlarla birlikte 15 izolat belirlenmiştir. Taranan izolatlardan 33 izolat YLA besiyerinde büyüme göstermemiştir. Şekil 3.5 ve Şekil 3.6' da taranan izolatlardan OBCC 1031, OBCC 5008, OBCC 03 ve ME 496 izolatlarının olası lovastatin miktarı pozitif kontrollere yakın olduğu görülmektedir. Ancak bu elde edilen zonların nedeni statin dışında başka bileşiklerden kaynaklandığı da düşünülmektedir. Bu nedenle pozitif sonuç veren izolatların ekstraktlarında lovastatin olup olmadığı ince tabaka kromotografisi ile belirlenmiştir.

3.2. Statin üretiminin onaylanması

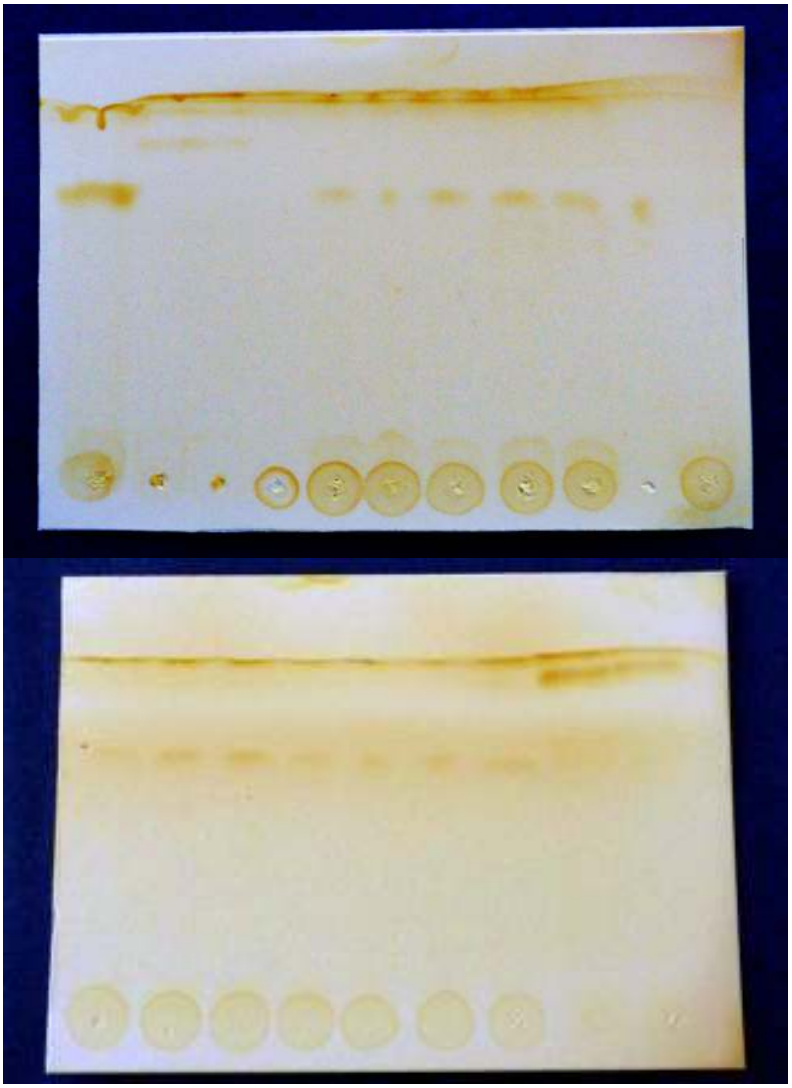
Agar disk difüzyon yöntemi ile seçilen makrofungusların, test mikroorganizmalarına karşı sağladıkları inhibisyon zonlarının statin kaynaklı olup olmadığı, ince tabaka kromatografisi ile belirlenmiştir. Bu amaçla, makrofungus izolatlarının ekstraktları, standart lovastatin ile ince tabaka kromatografi plakalarında birlikte değerlendirilmiştir. Çizelge 3.1. lovastatin standardının farklı hareketli fazlardaki Rf değerlerini ifade etmektedir. Fungal ekstraktlardaki lovastatinin ince tabaka kromatografik analizinde Rf değeri 0.85 yüksek olan hareketli faz A kullanılmıştır.

Çizelge 3.1. Farklı hareketli fazlarda lovastatin standardının Rf değerleri

Hareketli faz	**Lovastatin standardı Rf değeri**
A	0.85
B	0.57

A: Diklorometan etil asetat (70:30 v/v)
B: Etil asetat: Hekzan: asetik asit (70:30:6)

Test suşları *C.albicans* ve *N.crassa*' nın inhibisyonuna neden olan 11 fungal ekstraktan 6 tanesinin içerisinde lovastatin olduğu standardın Rf değeri ile ekstraktların Rf değerlerinin karşılaştırılmasıyla onaylanmıştır (Şekil 3.7).

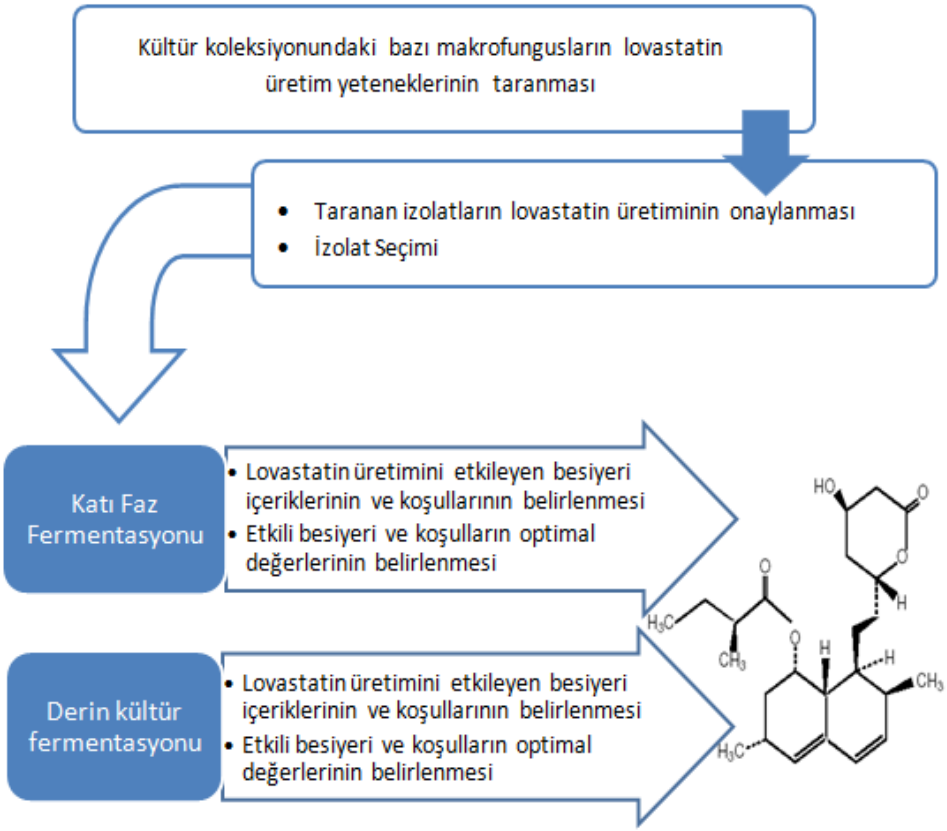


Şekil 3.7. Fungal ekstraktların ince tabaka kromotografik analizleri

OBCC 2001 (Lenzites betulina), OBCC 2002 (tanımlanmamış izolat), OBCC 1031 (*P. ostreatus*), OBCC 5022 (*Trametes versicolor*), OBCC 5023 (*Trametes versicolor*) *P. chrysosporium* ME 496 pozitif sonuç, OBCC 03 (*Ganoderma* sp.), OBCC 06 (*Clavariadelphus truncatus*), OBCC 23 (*Pycnoporus cinnabarius*), OBCC 5008 (*Ganoderma lucidum*), OBCC 5039 (*Ganoderma sp.*) negatif sonuç vermiştir.

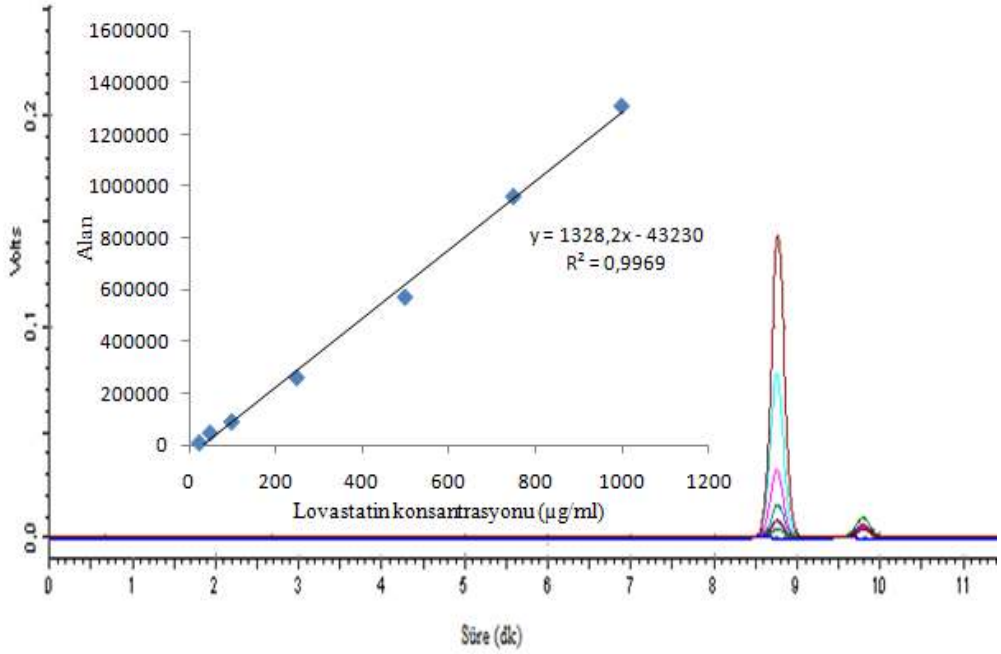
3.3. Statin üretiminin deneysel tasarım yöntemleri optimizasyonu

Tarama sonucu seçilen OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatları tarafından statin üretiminin optimizasyonunda derin kültür ve katı faz fermentasyonu olmak üzere iki farklı kültür yöntemi kullanılmıştır (Şekil 3.8). Her kültür yöntemi için lovastatin üretimini etkileyen besiyeri içerikleri ve koşulları ile bunların seviyeleri ve aralarındaki etkileşimler belirlenmiştir.



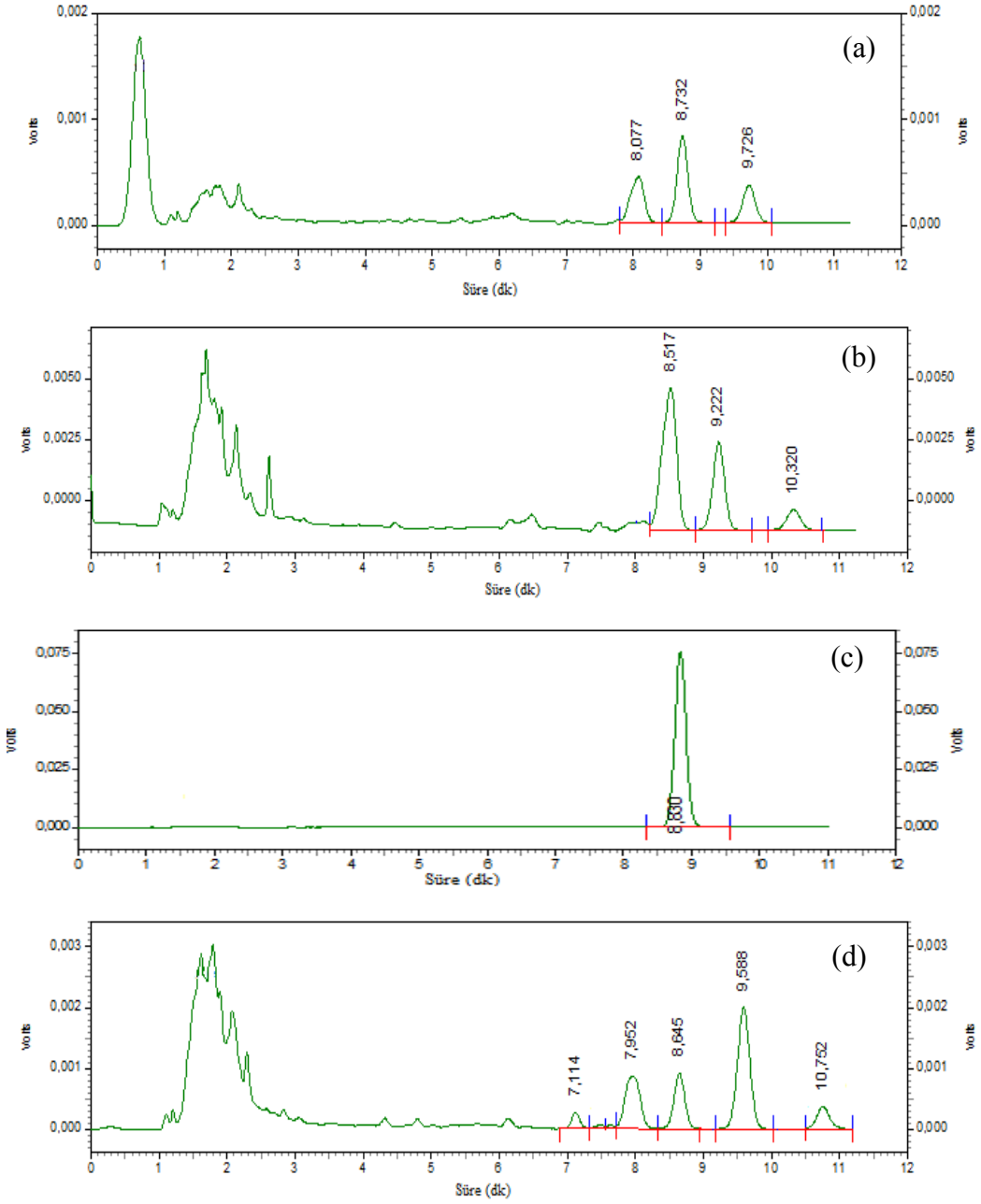
Şekil 3.8. OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatları tarafından statin üretim koşullarının optimizasyonu süreci

Katı faz ve derin kültür fermentasyonları sonucunda fermente ortamdan lovastatin ekstraksiyonu yapılmıştır. Elde edilen fungal ekstraktlardaki lovastatin varlığı ve miktar tayini yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) yöntemle analiz edilmiştir. Bunun için, lovastatin standardı II (Sigma) çözeltisinden farklı derişimlerde hazırlanan bir seri çözelti HPLC de analiz edilerek pik süresi (retention time) ve alan ölçümleri alınmış ve derişime karşı bu ölçüm sonuçları grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.9).



Şekil 3.9. Lovastatin standardının HPLC kromotogramı ve bu kromatogramdan elde edilen standart eğri

HPLC analizine göre lovastatin standardının pik verdiği zaman 8.76 dakika olarak belirlenmiştir. Örneklerdeki lovastatin miktarları, kromatogramlardan elde edilen eşitlik yardımıyla pik süresi ve alan verileri ile hesaplanmıştır. HPLC standart eğrisinin yatay ekseni lovastatin konsantrasyonları (µg/ml), dikey ekseni yüksek basınçlı sıvı kromatografisi sonucu CLASS-VP 6.1 (Shimadzu) programıyla hesaplanan alan değerleri yer almıştır.

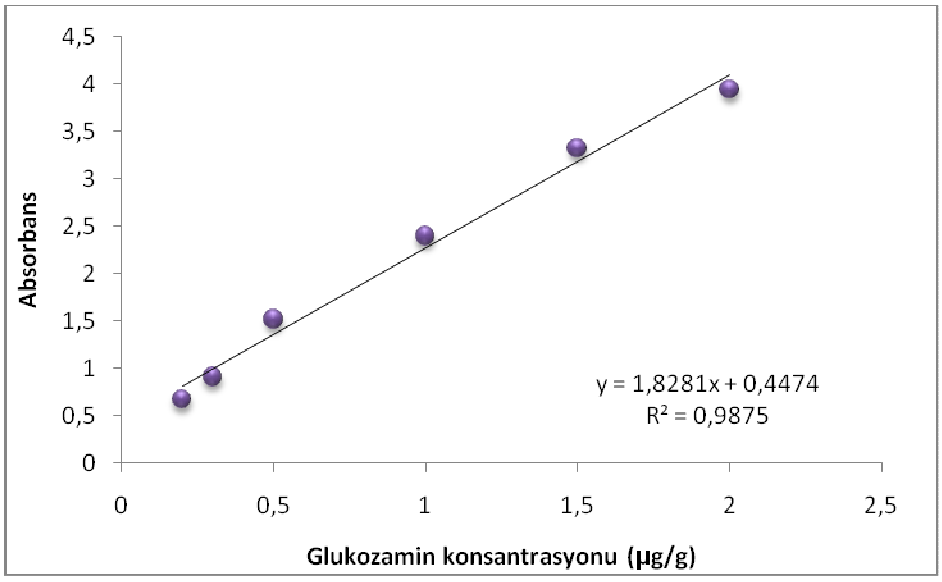


Şekil 3.10. (a) OBCC 2002 izolatının, (b) OBCC 1031 izolatının katı faz fermentasyonundan, (c) OBCC 2002 ve (d) OBCC 1031 izolatlarının derin kültür fermentasyonundan elde edilen bazı ekstraktların HPLC kromatogramı

Fungal ekstraktlardaki lovastatin varlığı standart lovastatin çözeltisi II' nin pik süresi 8.76 ile karşılaştırılarak belirlenirken, miktar tayini y = 1328.2x – 43230 eşitliği ile yapılmıştır (Şekil 3.9). Şekil 3.10' da görüldüğü üzere 8.73 (a), 8.51 (b) ve 8.83 (c), 8.64 (d) dakikalarında görülen pikler bazı fungal ekstraktlarda lovastatin varlığını

doğrulamıştır. Bununla birlikte farklı dakikalarda görülen piklerin fermentasyon sürecinde lovastatin dışında başka metabolitlerin üretildiğini veya safsızlık varlığını göstermiştir.

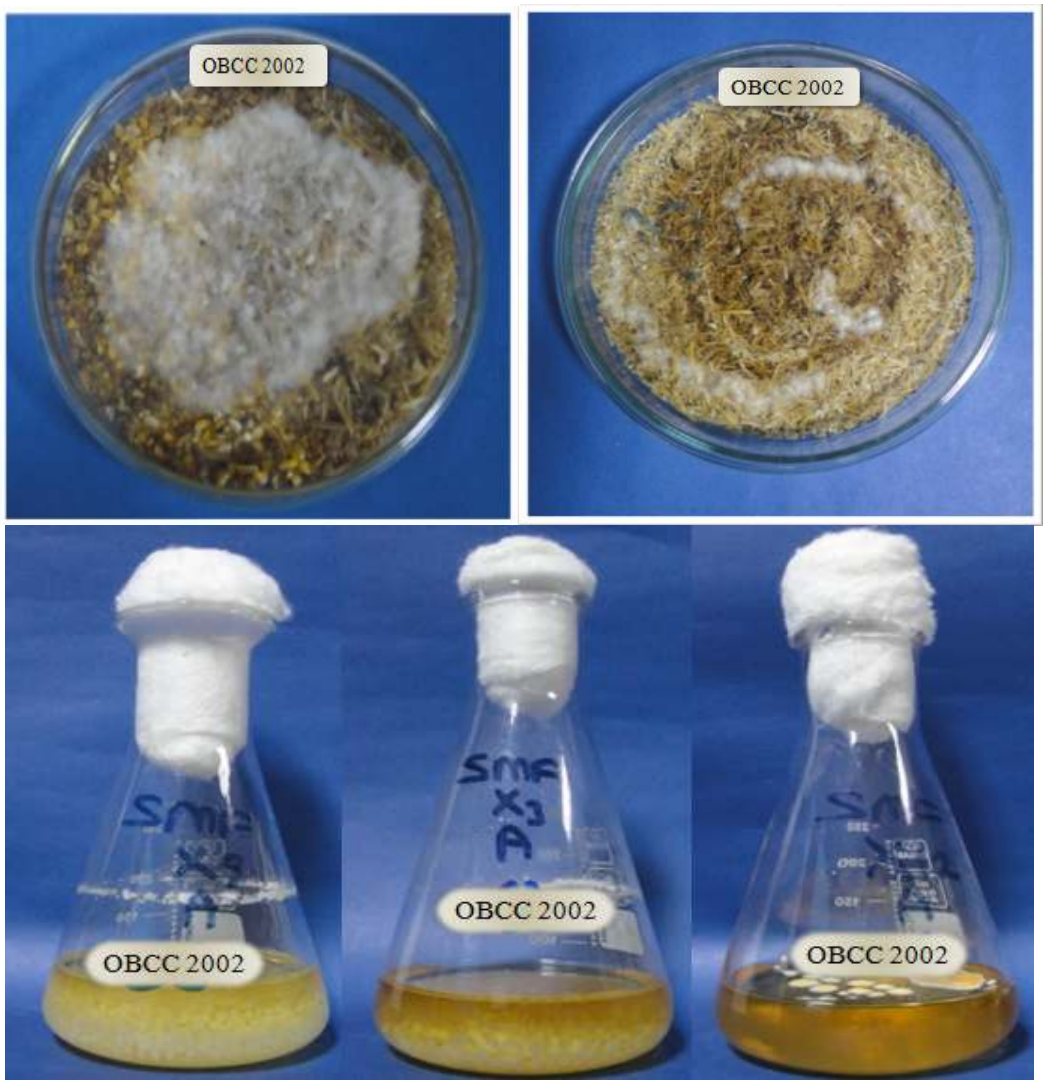
Katı faz fermentasyonu sonucu fermente ortamda fungal biyokütle miktarını ölçmek için glukozamin tayin yöntemi kullanılmıştır. Bunun için, farklı derişimlerde hazırlanan glukozamin standartları 650 nm dalga boyunda spektrofotometrik UV ölçümleri alınmış ve derişime karşı bu ölçüm sonuçları grafiğe geçirilerek bir standart eğrisi elde edilmiştir (Şekil 3.11). Bu standart eğri kullanılarak fermentasyon sonunda büyüyen fungal biyomas miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3.11. Glukozamin standartlarına ait standart eğri

3.3.1. OBCC 2002 izolatı tarafından statin üretiminin optimizasyonu

OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde etkin kültür yöntemini belirlemek amacıyla Plackett-Burman deney tasarımı kullanarak katı faz ve derin kültür fermentasyonu ile oluşturulan besiyerlerinde misel gelişiminin besiyeri içeriğine göre değişkenlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.12; Şekil 3.13).



Şekil 3.12. OBCC 2002 izolatının katı faz ve derin kültür fermentasyonunda miselyal gelişimi

3.3.1.1. Katı faz fermentasyonu ile lovastatin üretiminin optimizasyonu

OBCC 2002 izolatının katı faz fermentasyonu ile lovastatin üretiminde etkili olan bağımsız besiyeri değişkenleri Plackett-Burman deney tasarımı kullanılarak belirlenmiştir. İzolat OBCC 2002 tarafından Plackett Burman Tasarımı ile elde edilen verilerin analiz sonuçları Çizelge 3.2' de sunulmuştur.

Çizelge 3.2. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı

Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Lovastatin (mg/g)	Fungal biyomas (mg/g)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2.115	0.439
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0.485	0.647
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0.625	0.793
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	0	0.519
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0	0.663
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	0	0.711
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0	0.554
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0.18	0.664
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	1.685	0.772
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	1.39	0.664
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0.98	0.737
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	1.005	0.665

Katı faz fermentasyonunda buğday kepeği (X_1, Var1), arpa (X_2, Var2), pirinç kavuzu (X_3,Var3), mısır (X_4,Var4), yulaf (X_5,Var5), mineral tuz çözeltisi (X_6,Var6), laktoz (X_7,Var7), yeast ekstrakt (X_8,Var8), malt ekstrakt (X_9,Var9), partikül boyutu (X_{10},Var10) ve "dummy" (X_{11}, Var11) olmak üzere 11 farklı bileşen/koşulların lovastatin üretiminde etkileri Çizelge 3.3' te verilmiştir. Katsayıların işareti (Regression coefficient) ilgili değişkenin hangi düzeyinin lovastatin üretimi üzerinde etkili olduğu konusunda bilgi vermektedir. Pozitif etkiler (+) değişkenin üst düzeyinin, negatif etkiler (-) ise değişkenin alt düzeyinin etkili olduğunu ifade etmektedir. X_1, X_2, X_3, X_8 ve X_{11} değişkenlerinin etkilerinin 0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmüştür ($p<0.05$). Çizelge 3.3' e göre OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde X_1, X_2, X_3 ve X_{11} değişkenlerinin üst düzeylerinin, X_8 değişkenlerinin de alt düzeylerinin etkili olduğu görülmektedir. PB deney tasarımı ile oluşturulan katı faz fermentasyonu ile OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde katı substrat olarak sırasıyla yüksek seviyelerinde arpa, buğday kepeği ve pirinç kavuzunun artırıcı etkisi olduğu görülmüştür.

Çizelge 3.3. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SSF)

Factor	Regr. Coefficients; Var.:Lovastatin; R-sqr=,84077; Adj:,7678 (LOV 11 Factor Screening Design; MS Residual=,0055999 DV: Lovastatin					
	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(24)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,141444	0,012472	11,34084	0,000000	0,115703	0,16718
(1)Var1	0,071611	0,012472	5,74169	0,000006	0,045870	0,09735
(2)Var2	0,080778	0,012472	6,47666	0,000001	0,055037	0,10651
(3)Var3	0,062944	0,012472	5,04681	0,000037	0,037203	0,08868
(4)Var4	0,011778	0,012472	0,94433	0,354413	-0,013963	0,03751
(5)Var5	0,005944	0,012472	0,47662	0,637945	-0,019797	0,03168
(6)Var6	0,022278	0,012472	1,78620	0,086708	-0,003463	0,04801
(7)Var7	-0,003556	0,012472	-0,28508	0,778028	-0,029297	0,02218
(8)Var8	-0,031889	0,012472	-2,55681	0,017310	-0,057630	-0,00614
(9)Var9	0,018944	0,012472	1,51894	0,141842	-0,006797	0,04468
(10)Var10	-0,002056	0,012472	-0,16481	0,870472	-0,027797	0,02368
(11)Var11	0,045111	0,012472	3,61695	0,001378	0,019370	0,07085

Plackett-Burman deney tasarımı ile katı faz fermentasyonunda OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde katı substrat olarak arpanın ve partikül boyutunun etkili olduğu bulunmuştur. Cevap yüzey metodu ile bu iki değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının lovastatin üretimine etkisi araştırılmıştır. OBCC 2002 izolatının full faktöriyel deney tasarımı kullanılarak katı faz fermentasyonunda lovastatin üretimi ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.4' de verilmiştir. RSM analizlerinde aşağıdaki kuadratik eşitlik kullanılmıştır:

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i x_i + \sum \beta_{ij} x_i x_j + \sum \beta_{ii} x_i^2$$

Burada Y tahmin edilen tepki (yanıt), β_0 sabit terim, β_{ii} kareli terimlerin katsayısı, β_{ij} ikili etkileşimlerin katsayısı ve x_i açıklayıcı (bağımsız) değişkenlerin kodlanmış değerleridir. OBCC 2002 izolatının full faktöriyel deney tasarımı ile katı faz fermentasyonu sonucunda aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir:

$$\text{Lovastatin (mg)} = 84.7065 - 15.3626X_2 - 32.0578X_2^2 + 1.6046X_{10} - 34.4086X_{10}^2 - 8.6796X_2X_{10}$$

Çizelge 3.4' de görüldüğü gibi en yüksek lovastatin üretimi (139.45 mg/g) 1-2 mm partikül boyutuna sahip 5 g arpa ile katı faz fermentasyonunda 0.26 mg/g fungal biyomas ile gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.4. OBCC 2002 izolatının Full Faktöriyel Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SSF)

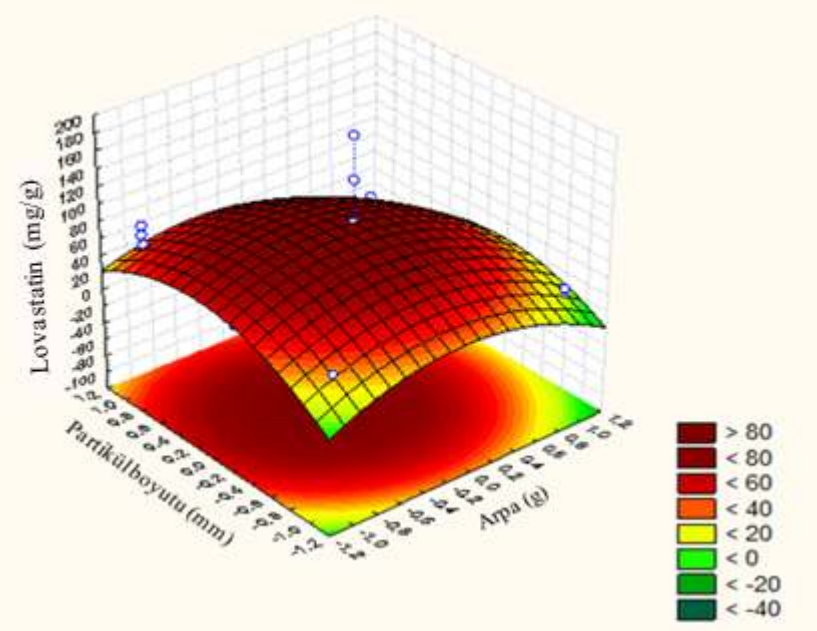
Besiyeri	Arpa (g)	Partikül Boyutu (mm)	Lovastatin miktarı (mg/g)		Fungal biyomas (mg/g)
			Öngörülen	Gözlenen	
1	8	2 - 4	4.48	6.18	0.152
2	8	0.5 - 1	1.27	15.23	0.083
3	8	1 - 2	37.285	21.62	0.104
4	5	2 - 4	51.9	19.42	0.040
5	5	0.5 - 1	48.69	26.41	0.112
6	5	1 - 2	84.705	139.455	0.263
7	2	2 - 4	35.2	65.985	0.096
8	2	0.5 - 1	31.995	40.315	0.097
9	2	1 - 2	68.01	28.91	0.119

Çizelge 3.5. OBCC 2002 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SSF)

Değişim kaynağı	**Kareler toplamı (SS)**	**Serbestlik derecesi (SD)**	**Kareler ortalaması**	**F**	**p**
Model	18468.48	5	3993.70	3.10	<0.001
Kalan	27059.95	21	1288.57		
Toplam	45528.43	26			

Belirlilik katsayısı (R^2) = 0.41, Korelasyon katsayısı (R) = 0.26

Çizelge 3.5 incelendiğinde arpanın doğrusal ve karesel, partikül boyutunun karesel etkileri anlamlı görülmektedir. Partikül boyutu ve arpanın etkileşimlerinin lovastatin üretiminde etkili olduğu full faktöriyel deney tasarımı ile desteklenmiştir. Analiz sonucu elde edilen dimensiyonel grafikte arpa ve partikül boyutunun belirli miktarlarda etkileşimleri sonucu üretilen lovastatin miktarları görülmektedir (Şekil 3.13).



Şekil 3.13. OBCC 2002 izolatının RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SSF)

Optimizasyon sonucunda partikül boyutu 1-2 mm olan 5 g arpa ile yapılan katı faz fermentasyonu ile OBCC 2002 izolatının maksimum lovastatin üretimi gerçekleştirilmiştir.

3.3.1.2. Derin kültür fermentasyonu ile lovastatin üretiminin optimizasyonu

OBCC 2002 izolatının derin kültür fermentasyonu ile lovastatin üretimini etkileyen bağımsız besiyeri değişkenleri de Plackett-Burman deney tasarımı ile belirlenmiştir. Derin kültür fermentasyonunda elde edilen verilerin analiz sonuçları Çizelge 3.6' da sunulmuştur. Laktoz (X_1, Var1), glikoz (X_2, Var2), gliserol (X_3, Var3), maltoz (X_4, Var4), yeast ekstrakt (X_5, Var5), malt ekstrakt (X_6, Var6), pepton (X_7, Var7), amonyum sülfat (X_8, Var8), NaCl (X_9, Var9), tiamin (X_{10}, Var10) ve karıştırma hızı (X_{11},Var11) olmak üzere 11 farklı değişkenin lovastatin üretimine etkileri Çizelge3.7' de verilmiştir. Çizelge 3.6' da görüldüğü üzere OBCC 2002 izolatının en yüksek lovastatin üretimi (9.468 mg/l) 10 numaralı besiyeri ortamında gerçekleşmiştir.

Çizelge 3.6. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı

Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Lovastatin (mg/l)	Fungal biyomas (mg/l)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	5.671	0.0141
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0	0.0019
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0	0.0089
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	0	0.0018
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	2.556	0.0019
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	4.452	0.0004
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	2.080	0.0070
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	2.240	0.0077
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	7.071	0.0133
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	9.468	0.0016
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	4.545	0.0058
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	1.704	0.0018

Çizelge 3.7. OBCC 2002 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SmF)

	Regr. Coefficients; Var.:Lovastatin; R-sqr=,98659; Adj:,98045 (LO 11 Factor Screening Design; MS Residual=,0000002 DV: Lovastatin					
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(24)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,003361	0,000068	49,3980	0,000000	0,003221	0,00350
(1)Var1	0,001028	0,000068	15,1052	0,000000	0,000887	0,00116
(2)Var2	0,001639	0,000068	24,0866	0,000000	0,001498	0,00177
(3)Var3	0,001028	0,000068	15,1052	0,000000	0,000887	0,00116
(4)Var4	-0,000917	0,000068	-13,4722	0,000000	-0,001057	-0,00077
(5)Var5	-0,001194	0,000068	-17,5547	0,000000	-0,001335	-0,00105
(6)Var6	-0,000472	0,000068	-6,9402	0,000000	-0,000613	-0,00033
(7)Var7	0,000028	0,000068	0,4082	0,686711	-0,000113	0,00016
(8)Var8	-0,000028	0,000068	-0,4082	0,686711	-0,000168	0,00011
(9)Var9	0,000694	0,000068	10,2062	0,000000	0,000554	0,00083
(10)Var10	0,000583	0,000068	8,5732	0,000000	0,000443	0,00072
(11)Var11	0,000250	0,000068	3,6742	0,001195	0,000110	0,00039

Çizelge 3.7' ye göre OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde X_1, X_2, X_3, X_9, X_{10} X_{11} değişkenlerinin üst düzeyleri, X_4, X_5 ve X_6 değişkenlerinin de alt düzeyleri etkili olmuştur. PB deney tasarımı ile oluşturulan derin kültür fermentasyonu ile OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde karbon kaynağı olarak glikozun artırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Karıştırma hızı arttıkça lovastatin miktarında artabileceği görülmektedir. Tiamin ve NaCl yüksek seviyelerinin lovastatin üretimini olumlu yönde etkilediği görülmüştür. Plackett-Burman deney tasarımı ile derin kültür fermentasyonunda OBCC

2002 izolatının lovastatin üretiminde besiyeri bileşeni glikoz ve pepton ile karıştırma hızının lovastatin üretiminde önemli değişkenler olduğu bulunmuştur. Bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının lovastatin üretimine etkisi araştırılmıştır. OBCC 2002 izolatının Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak derin kültür fermentasyonu ile lovastatin üretimi sonuçları Çizelge 3.8' de, lovastatin miktarlarının varyans ve regresyon analizi sonuçları Çizelge 3.9' da verilmiştir.

Çizelge 3.8. OBCC 2002 izolatının Box-Behnken Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SmF)

Besiyeri	Glikoz (%)	Pepton (%)	Karıştırma hızı (rpm)	Lovastatin miktarı (mg/l)		Fungal biyomas (mg/l)
				Öngörülen	Gözlenen	
1	3	1	200	0	0	0.01426
2	3	0.5	100	0.75201	1.99134	0.00188
3	1	0.5	0	9.67709	12.5166	0.00985
4	3	0.5	100	0.75201	0	0.00169
5	1	0	100	1.36179	0	0.00223
6	3	0	0	1.47772	0	0.00083
7	3	0.5	100	0.75201	0	0.00700
8	3	1	0	1.89779	0.56009	0.00733
9	5	1	100	0	0	0.01311
10	1	1	100	1.50181	0	0.00073
11	3	0.5	100	0.75201	1.76872	0.00718
12	5	0.5	200	3.71802	0.87851	0.00231
13	5	0.5	0	1.7773	1.75321	0.01589
14	1	0.5	200	1.54542	1.56950	0.00220
15	3	0	200	0	0	0.00840
16	5	0	100	0	0	0.00135
17	3	0.5	100	0.75201	0	0.00187

Çizelge 3.9. OBCC 2002 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SmF)

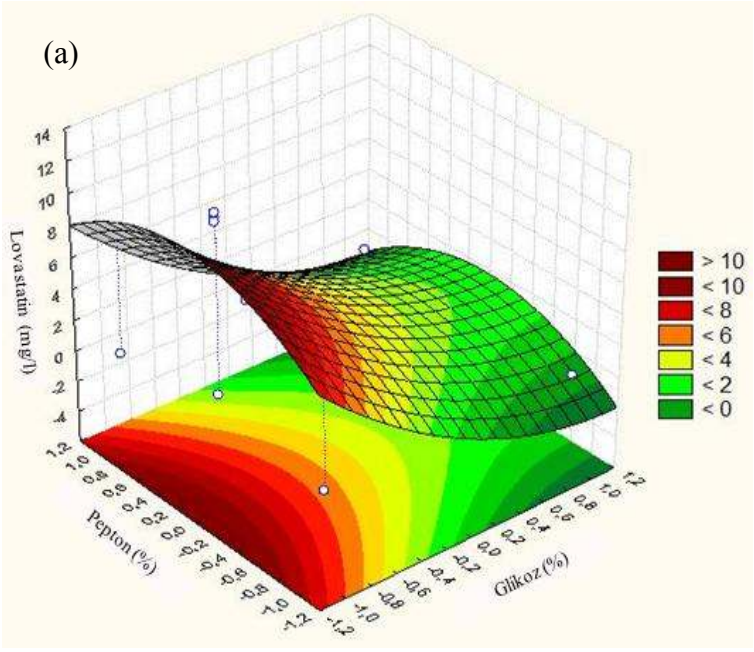
Değişim kaynağı	**Kareler toplamı (SS)**	**Serbestlik derecesi (SD)**	**Kareler ortalaması**	**F**	**p**
Model	329.7168	9	36.64	14.48	<0.001
Kalan	103.6241	41	2.53		
Toplam	433.3409	50			

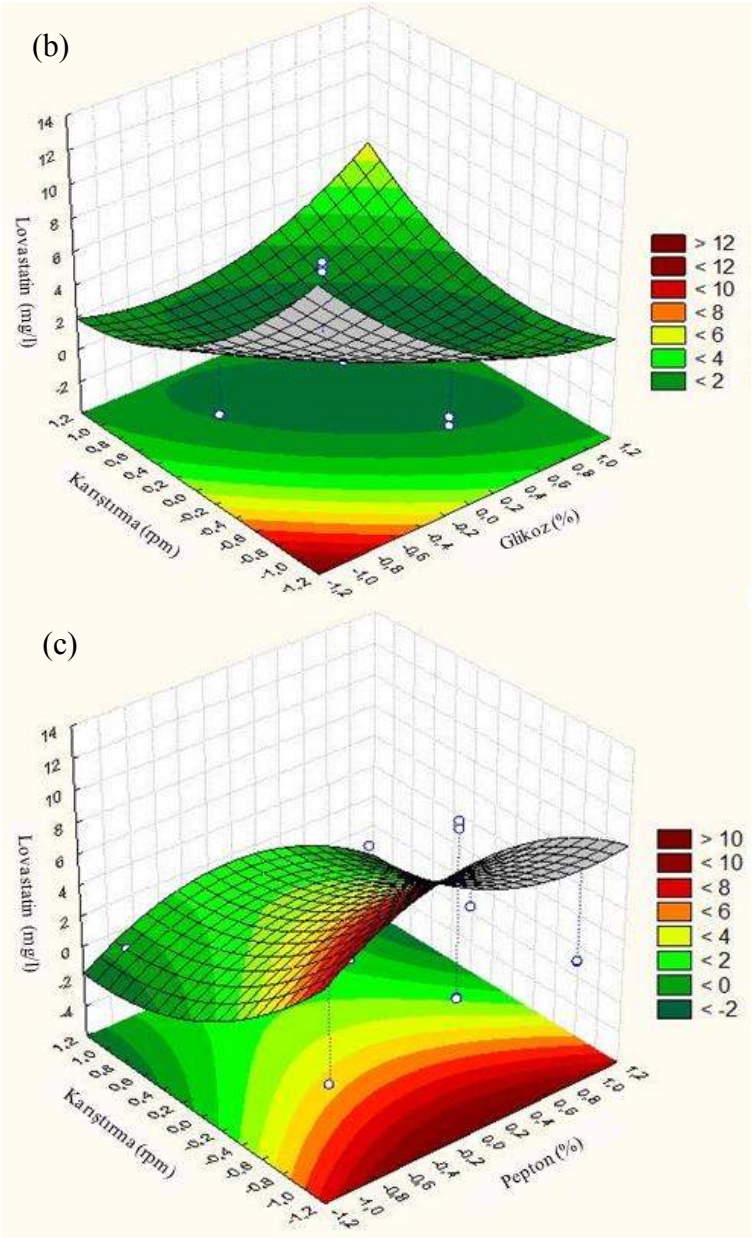
Belirlilik katsayısı (R^2) = 0.75, Korelasyon katsayısı (R) = 0.69

Çizelge 3.9 incelendiğinde kullanılan modelin anlamlı olduğu Lack of fit sınamasından anlaşılmaktadır ($F=14.48$, $p<0.001$). Glikoz ve karıştırma hızının karesel etkisi lovastatin üretiminde artırıcı etki gösterirken peptonun karesel etkisi azaltıcı etki göstermiştir. OBCC 2002 izolatının Box-Behnken deney tasarımı ile derin kültür fermentasyonu sonucunda aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir:

$$\text{Lovastatin (mg)} = 0.75201 - 1.43180X_2 + 1.64371X_2^2 + 0.07001X_5 - 2.39572X_5^2 - 1.54774X_{11} + 1.78373X_{11}^2 + 2.51810X_2X_{11} - 1.14002\,X_5X_{11}$$

Şekil 3.14' te glikoz, pepton ve karıştırma hızının kombinasyonları ile etkileşimlerini gösteren grafik verilmiştir. Cevap yüzey metodolojisi analizi sonucunda OBCC 2002 izolatının lovastatin üretimi için derin kültür fermentasyonunda kullanılan besiyeri bileşenleri glikoz % 1, pepton % 0.5, NaCl 0.4 g/l, tiamin 1 mg/l ve karıştırma hızı 0 rpm optimal olarak belirlenmiştir.





Şekil 3.14. İzolat OBCC 2002 RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SmF)

3.3.2. OBCC 1031 izolatı tarafından statin üretiminin optimizasyonu

OBCC 1031 izolatının derin kültür ve katı faz fermentasyonu ile lovastatin üretiminde misel gelişiminin besiyeri içeriğine göre değişkenlik gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.15).



Şekil 3.15. OBCC 1031 izolatının katı faz ve derin kültür fermentasyonunda miselyal gelişimi

3.3.2.1. Katı faz fermentasyonu ile lovastatin üretiminin optimizasyonu

OBCC 1031 izolatının Plackett-Burman deney tasarımı kullanarak katı faz fermentasyonu sonucu üretilen lovastatin miktarları Çizelge 3.10, istatiksel program analizleri Çizelge 3.11' de sunulmuştur.

Çizelge 3.10. OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı (SSF)

Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Lovastatin (mg/g)	Fungal biyomas (mg/g)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	0.195	0.652
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	0.26	0.107
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	0.25	0.374
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	0.475	0.354
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	0.42	0.673
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	0.305	0.708
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	0.24	1.070
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	0.175	0.735
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	0.3	0.607
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	0.24	0.535
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	0.26	0.337
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	0.205	0.372

Çizelge 3.11. OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SSF)

	Regr. Coefficients; Var.:Lovastatin; R-sqr=,9959; Adj:,99402 (LOV 11 Factor Screening Design; MS Residual=,0000018 DV: Lovastatin					
Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(24)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,056056	0,000226	248,3986	0,000000	0,055590	0,05652
(1)Var1	-0,002333	0,000226	-10,3397	0,000000	-0,002799	-0,00186
(2)Var2	0,000500	0,000226	2,2156	0,036452	0,000034	0,00096
(3)Var3	-0,006889	0,000226	-30,5267	0,000000	-0,007355	-0,00642
(4)Var4	-0,000944	0,000226	-4,1851	0,000330	-0,001410	-0,00047
(5)Var5	-0,005222	0,000226	-23,1412	0,000000	-0,005688	-0,00475
(6)Var6	0,004222	0,000226	18,7099	0,000000	0,003756	0,00468
(7)Var7	0,005444	0,000226	24,1259	0,000000	0,004979	0,00591
(8)Var8	0,005556	0,000226	24,6183	0,000000	0,005090	0,00602
(9)Var9	0,000167	0,000226	0,7385	0,467342	-0,000299	0,00063
(10)Var10	-0,008278	0,000226	-36,6813	0,000000	-0,008744	-0,00781
(11)Var11	-0,008278	0,000226	-36,6813	0,000000	-0,008744	-0,00781

Çizelge 3.11 incelendiğinde X_9 değişkeni dışındaki tüm değişkenlerin etkilerinin 0.05 anlamlılık düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı olduğu görülmektedir ($p<0.05$). Çizelge 3.12' ye göre OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde X_2, X_6, X_7 ve X_8 değişkenlerinin üst düzeyleri, X_1, X_3, X_4, X_5, X_{10} ve X_{11} değişkenlerinin de alt düzeyleri

etkili olmuştur. PB deney tasarımı ile oluşturulan katı faz fermentasyonu ile OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde katı substrat olarak arpanın artırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Bunun yanında ilave azot kaynağı olarak yeast ekstraktın da düşük seviyelerinde lovastatin üretiminde olumlu etkilemiştir.

Plackett-Burman deney tasarımı ile katı faz fermentasyonunda OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde besiyeri bileşeni arpa ve yeast ekstrakt ile partikül boyutunun önemli olduğu bulunmuştur. Önemli bulunan bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının lovastatin üretimine etkisi araştırılmıştır. OBCC 1031 izolatının Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak katı faz fermentasyonunda lovastatin üretimi ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.12 'de verilmiştir.

Çizelge 3.12. OBCC 1031 izolatının Box-Behnken Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SSF)

Besiyeri	Arpa (g)	Yeast ekstrakt (%)	Partikül Boyutu (mm)	Lovastatin miktarı (mg/g)		Fungal biyomas (mg/g)
				Öngörülen	Gözlenen	
1	5	1	2 - 4	10.49049	9,152	0,440
2	5	0,5	1 - 2	17.01339	5,813	0,164
3	2	0,5	0,5 - 1	25.72002	25,306	0,699
4	5	0,5	1 – 2	17.01339	14,681	0,402
5	2	0	1 - 2	8.58797	7,663	0,598
6	5	0	0,5 - 1	4.80725	6,145	0,551
7	5	0,5	1 - 2	17.01339	33,427	0,967
8	5	1	0,5 - 1	32.66452	33,917	0,818
9	8	1	1 - 2	18.79474	19,718	0,537
10	2	1	1 - 2	28.65961	27,820	0,537
11	5	0,5	1 - 2	17.01339	16,559	0,410
12	8	0,5	2 - 4	15.99428	16,408	0,332
13	8	0,5	0,5 - 1	37.14569	34,968	0,132
14	2	0,5	2 - 4	32.62216	34,798	0,128
15	5	0	2 - 4	12.73201	11,479	0,142
16	8	0	1 – 2	13.25063	14,089	0,248
17	5	0,5	1 - 2	17.01339	14,586	0,705

OBCC 1031 izolatının fungal biyoması 0.128 mg/g iken üretilen lovastatin miktarı 34.798 mg/g (öngörülen 32.622 mg/g) bulunurken fungal biyomas 0.132 mg/g iken lovastatin miktarı 34.968 mg/g (öngörülen 37.145 mg/g) olarak bulunmuştur. OBCC

1031 izolatının Box-Behnken deney tasarımı ile katı faz fermentasyonu sonucunda aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir:

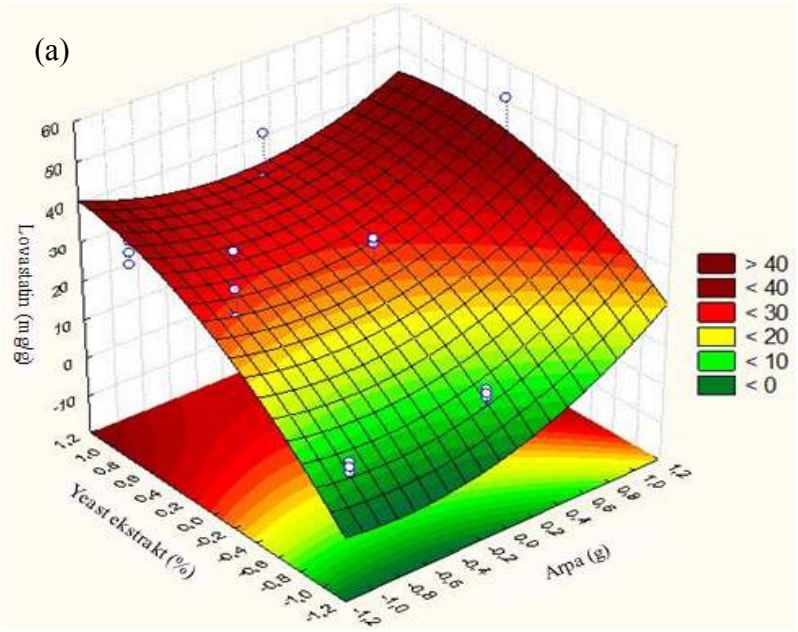
$$\text{Lovastatin (mg)} = 17.0134 - 1.30055X_2 + 6.50341X_2^2 + 6.40394X_8 - 6.19356X_8^2 - 3.56232X_{10} + 4.35374X_{10}^2 - 3.63189\ X_2X_8 - 7.01339\ X_2\ X_{10} - 7.52470\ X_8\ X_{10}$$

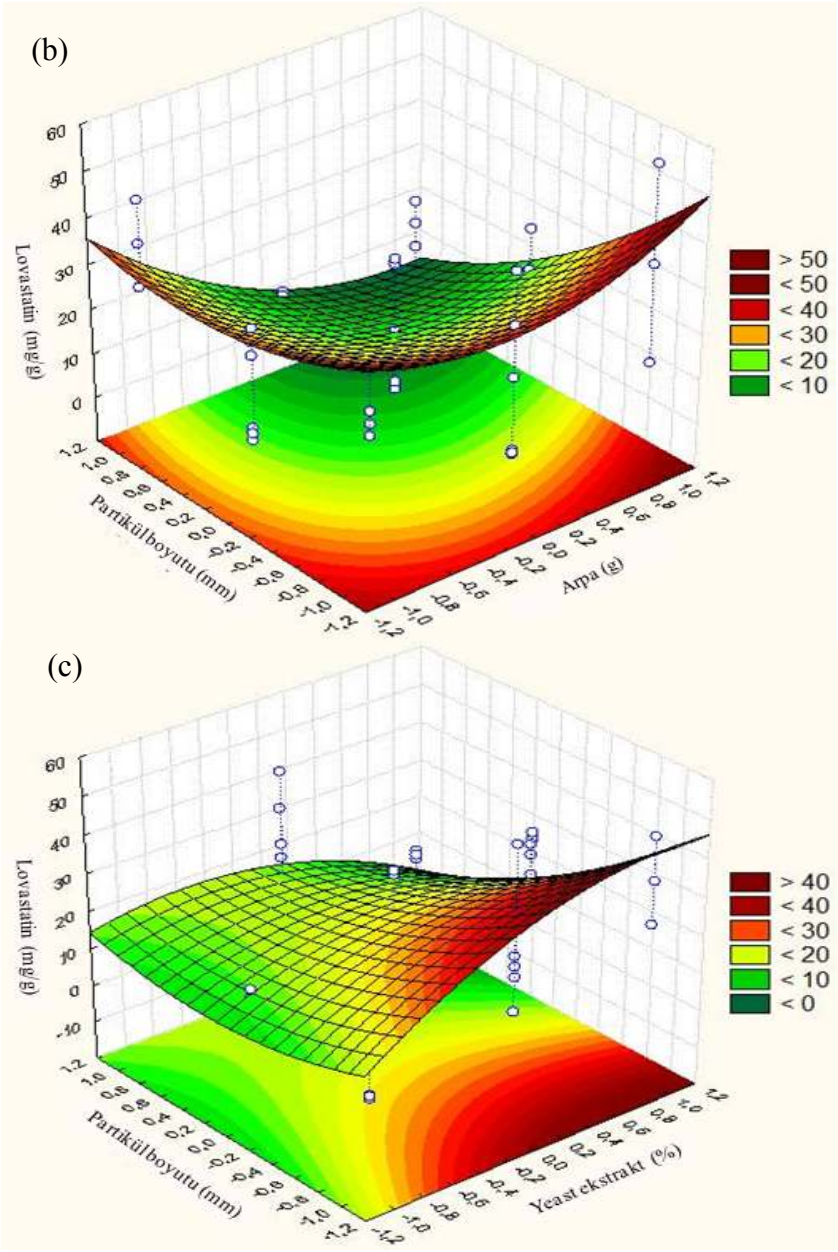
Çizelge 3.13. OBCC 1031 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SSF)

Değişim kaynağı	**Kareler toplamı (SS)**	**Serbestlik derecesi (SD)**	**Kareler ortalaması**	**F**	**p**
Model	4074.581	9	452.73	6.40	<0.001
Kalan	2849.581	41	70.66		
Toplam	6924.162	50			

Belirlilik katsayısı (R^2) = 0.57, Korelasyon katsayısı (R) = 0.48

Çizelge 3.13 incelendiğinde modelin anlamlı olduğu Lack of fit sınamasından görülmektedir (F=6.40, p<0.001). Arpanın karesel yeast ekstraktın ise doğrusal etkileri anlamlı görülmektedir.





Şekil 3.16. (a, b,c) İzolat OBCC 1031 RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SSF)

Lovastatin üretimini partikül boyutunun etkilemediği arpa ile yeast ekstraktın etkileşimleri ile üretimin etkilendiği belirlenmiştir. Şekil 3.16' da üç değişkenin (Arpa, yeast ekstrakt ve partikül boyutu) kombinasyonları ile etkileşimlerini gösteren grafikler verilmiştir. Değişkenlerden birinin miktarı sabit tutularak diğer iki değişkenin etkileşimleri sonucu olası lovastatin miktarı belirlenmiştir. OBCC 1031 izolatının katı faz fermentasyonunda, arpa miktarı (8 g) sabit tutulduğunda arpanın partikül boyutu

(0.5-1 mm) düşük seviye de iken yeast ekstrakt miktarının (% 1) yüksek seviyesinde yüksek lovastatin üretildiği görülmüştür (Şekil 3.16a). Bununla birlikte ilave azot kaynağı olan yeast ekstraktın (% 1) düşük miktarında partikül boyutu 0.5-1 mm olan arpa miktarı (8 g) arttıkça, lovastatin üretiminin yine arttığı görülmüştür (Şekil 3.16b).

3.3.2.2. Derin kültür fermentasyonu ile lovastatin üretiminin optimizasyonu

OBCC 1031 izolatının Plackett Burman Tasarımı ile derin kültür fermentasyonu sonunda lovastatin ve fungal biyomas analiz sonuçları Çizelge 3.14' de ve istatistiksel analiz sonuçları Çizelge 3.15' te sunulmuştur.

Çizelge 3.14. OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Matrisi ve Lovastatin Miktarı (SmF)

Deneme	X_1	X_2	X_3	X_4	X_5	X_6	X_7	X_8	X_9	X_{10}	X_{11}	Lovastatin (mg/l)	Fungal biyomas (mg/l)
1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	+1	2.349	0.0150
2	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	2.122	0.0026
3	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	2.180	0.0123
4	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	1.793	0.0026
5	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	2.536	0.0025
6	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	-1	1.936	0.0019
7	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	+1	1.867	0.0138
8	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	+1	1.822	0.0121
9	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	+1	1.878	0.0077
10	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	-1	1.826	0.0036
11	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	+1	1.827	0.0112
12	+1	-1	+1	+1	+1	-1	-1	-1	+1	-1	-1	13.801	0.0041

Çizelge 3.15' e göre OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde X_2 ve X_5 değişkenlerinin üst düzeyleri, X_1, X_3 ve X_{11} değişkenlerinin de alt düzeyleri etkili olmuştur. PB deney tasarımı ile oluşturulan derin kültür fermentasyonu ile OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde karbon kaynağı olarak glikozun artırıcı etkisi olduğu görülmüştür. Bunun yanında azot kaynağı olarak yeast ekstraktın da yüksek seviyelerinde lovastatin üretiminde olumlu etkilemiştir. Karıştırma hızının düşük seviyesinin lovastatin miktarını artırdığı görülmüştür. Plackett-Burman deney tasarımı ile derin kültür fermentasyonunda OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde besiyeri bileşeni glikoz ve yeast ekstrakt ile karıştırma hızının önemli olduğu bulunmuştur.

Önemli bulunan bu üç değişkenin birbirleri ile etkileşimlerinin ve miktarlarının lovastatin üretimine etkisi araştırılmıştır.

Çizelge 3.15 OBCC 1031 izolatının PB Deney Tasarımı Analiz Sonuçları (SmF)

Regr. Coefficients; Var.:Lovastatin; R-sqr=,84516; Adj:,77419
11 Factor Screening Design; MS Residual=0
DV: Lovastatin

Factor	Regressn Coeff.	Std.Err.	t(24)	p	-95,% Cnf.Limt	+95,% Cnf.Limt
Mean/Interc.	0,002139	0,000028	77,00000	0,000000	0,002082	0,002196
(1)Var1	-0,000139	0,000028	-5,00000	0,000042	-0,000196	-0,000082
(2)Var2	0,000139	0,000028	5,00000	0,000042	0,000082	0,000196
(3)Var3	-0,000139	0,000028	-5,00000	0,000042	-0,000196	-0,000082
(4)Var4	0,000028	0,000028	1,00000	0,327287	-0,000030	0,000085
(5)Var5	0,000139	0,000028	5,00000	0,000042	0,000082	0,000196
(6)Var6	0,000028	0,000028	1,00000	0,327287	-0,000030	0,000085
(7)Var7	-0,000028	0,000028	-1,00000	0,327287	-0,000085	0,000030
(8)Var8	-0,000028	0,000028	-1,00000	0,327287	-0,000085	0,000030
(9)Var9	-0,000028	0,000028	-1,00000	0,327287	-0,000085	0,000030
(10)Var10	0,000028	0,000028	1,00000	0,327287	-0,000030	0,000085
(11)Var11	-0,000139	0,000028	-5,00000	0,000042	-0,000196	-0,000082

Çizelge 3.16 OBCC 1031 izolatının Box-Behnken Deneysel Tasarımı, Deneysel ve Tahmin Edilen değerler (SmF)

Besiyeri	Glikoz (%)	Yeast ekstrakt (%)	Karıştırma hızı (rpm)	Lovastatin miktarı (mg/l)		Fungal biyomas (mg/l)
				Öngörülen	Gözlenen	
1	3	1	200	112.1035	114.817	0.00997
2	3	0.5	100	12.2997	11.587	0.00283
3	1	0.5	0	2.1809	6.0458	0.01519
4	3	0.5	100	12.2997	6.1536	0.00264
5	1	0	100	9.3453	8.1948	0.00274
6	3	0	0	84.6001	81.885	0.00179
7	3	0.5	100	12.2997	33.456	0.01522
8	3	1	0	37.4903	40.362	0.01480
9	5	1	100	44.7423	45.892	0.00898
10	1	1	100	22.1699	15.432	0.00376
11	3	0.5	100	12.2997	0.670	0.01039
12	5	0.5	200	4.8043	0.939	0.00422
13	5	0.5	0	7.7899	3.767	0.02141
14	1	0.5	200	0	3.919	0.00244
15	3	0	200	4.7166	1.844	0.01074
16	5	0	100	0	4.027	0.00284
17	3	0.5	100	12.2997	9.630	0.00251

OBCC 1031 izolatının Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak katı faz fermentasyonunda lovastatin üretimi ile ilgili sonuçlar Çizelge 3.16 'de verilmiştir. Çizelge 3.17' de varyans analizi ve regresyon analizi sonuçları verilmiştir. OBCC 1031 izolatının Box-Behnken deney tasarımı ile derin kültür fermentasyonu sonucunda aşağıdaki eşitlik elde edilmiştir:

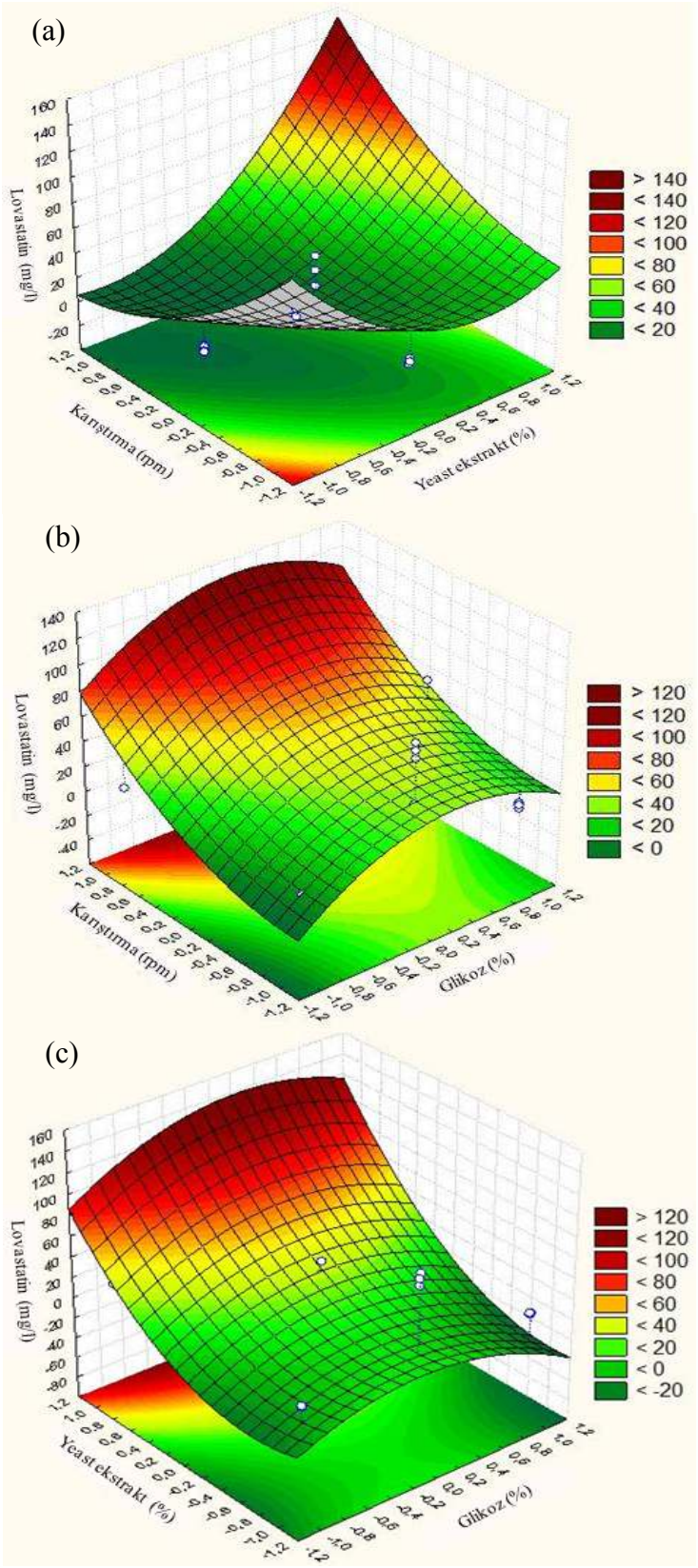
$$\text{Lovastatin (mg)} = 12.2997 + 2.6293X_2 - 24.9863X_2^2 + 15.0692X_5 + 31.0735X_5^2 - 1.3176X_{11} + 16.3544X_{11}^2 + 8.6569\,X_2\,X_5 - 0.1752\,X_2\,X_{11} + 38.6242\,X_5\,X_{11}$$

Çizelge 3.17 incelendiğinde modelin anlamlı olduğu Lack of fit sınamasından anlaşılmaktadır ($F=82.27$, $p<0.001$). Ayrıca değişkenlerin tüm etkileri de istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur.

Çizelge 3.17 OBCC 1031 izolatının Varyans ve Regresyon Analizi Sonuçları (SmF)

Değişim kaynağı	**Kareler toplamı (SS)**	**Serbestlik derecesi (SD)**	**Kareler ortalaması**	**F**	**p**
Model	47920.31	9	5324.48	82.27	<0.001
Kalan	2653.69	41	64.72		
Toplam	50574	50			
Belirlilik katsayısı (R^2) = 0.93, Korelasyon katsayısı (R) = 0.92					

Lovastatin üretiminde yeast ekstraktın artırıcı etkisi olduğu belirlenmiştir. Karıştırma hızının karesel etkisi ise lovastatin miktarını artırıcı yönde etkilediği görülmüştür. Şekil 3.17' te üç değişkenin (glikoz, yeast ekstrakt ve karıştırma hızı) kombinasyonları ile etkileşimlerini gösteren grafikler verilmiştir. OBCC 1031 izolatının derin kültür fermentasyon ortamında besiyeri bileşeni olan glikoz miktarı % 3 olduğunda yeast ekstraktın yüksek seviyesi (% 1) ve karıştırma hızının yüksek seviyesi (200 rpm) lovastatin üretimini artırıcı etki göstermiştir (Şekil 3.17a,b,c).



Şekil 3.17. (a, b, c) İzolat OBCC 1031 RSM tasarımı ile statin üretimi analizi (SmF)

Sonuç olarak, OBCC 2002 ve OBCC 1031 makrofungus izolatlarının lovastatin üretiminde etkin kültür yöntemi ve etkin besiyeri bileşen/koşulları deneysel tasarım yöntemleri ile belirlenmiştir. Katı faz ve derin kültür fermentasyon sürecinde optimal koşullar sağlandığında lovastatin üretim miktarı önemli ölçüde değişkenlik göstermiştir (Çizelge 3.18).

Çizelge 3.18. Seçilen izolatların optimizasyondan önce ve sonra lovastatin miktarlarının karşılaştırılması

Kültür tipi	**Katı faz Fermentasyonu (mg/g)**		**Derin kültür Fermentasyonu (mg/l)**	
İzolat kodu	**OBCC 2002**	**OBCC 1031**	**OBCC 2002**	**OBCC 1031**
Optimize edilmeden önce	0.699	0.171	1.556	2.237
PB ile optimizasyondan sonra	2.115	0.475	9.468	13.801
RSM ile optimizasyondan sonra	139.455	34.968	12.516	114.817

Çizelge 3.18' e göre OBCC 2002 izolatı için lovastatin üretiminde etkin kültür yönteminin katı faz fermentasyonu, OBCC 1031 izolatı için lovastatin üretiminde etkin kültür yönteminin derin kültür fermentasyonu olduğu belirlenmiştir. Plackett-Burman deney tasarımı ile OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatının lovastatin üretimi katı faz fermentasyonunda 3 kat, derin kültür fermentasyonunda 6 kat arttırılmıştır. Bu kullanılan PB tasarım modelinin lovastatin üretimine uygun bir model olduğu görülmüştür. Katı faz fermentasyonunun full faktöriyel deney tasarımı ile OBCC 2002 izolatının PB ile üretilen lovastatin miktarından yaklaşık 66 kat daha fazla lovastatin elde edilmiştir. Aynı kültür tipinde Box-Behnken deney tasarımı ile OBCC 1031 izolatının optimize edilmeden önce üretilen lovastatin miktarından 8 kat daha fazla üretimi sağlanmıştır. OBCC 1031 izolatının derin kültür fermentasyonunda aynı Box-Behnken deney tasarımı kullanılarak optimize edilmeden önce üretilen lovastatin miktarından yaklaşık 51 kat daha fazla lovastatin elde edilmiştir.

3.3.3. Seçilen izolatların özellikleri

Çalışmamızın materyalini oluşturan iki makrofungus örneği, Eskişehir il sınırları içinde değişik lokalitelerden toplanarak dikaryotik misel formunda izole edilmiş, koleksiyon kodları verilmiş ve Fungikültür laboratuvarı bünyesinde oluşturulan "Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu "na dahil edilmiştir (Şekil 3.18).

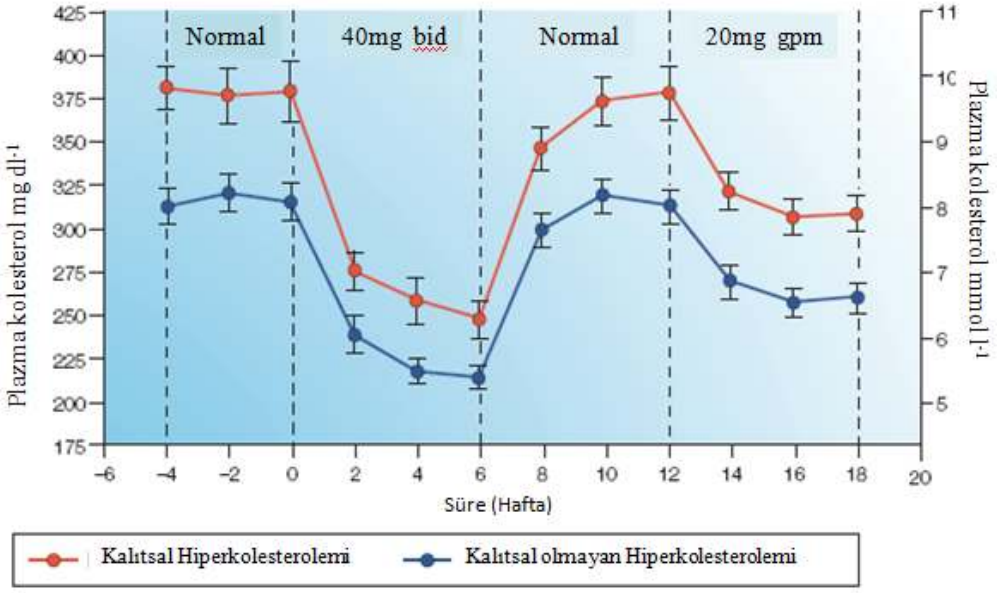


Şekil 3.18. OBCC 1031 (a) ve OBCC 2002 (b) izolatlarının makro görüntüsü

OBCC 1031 izolatı 04.11.2008 tarihinde Anadolu Üniversitesi Yunus Emre kampüsünde bir *Populus* spp. tomruğu üzerinde (Doç. Dr. Mustafa Yamaç tarafından) belirlenmiş olup, OBCC 2002 izolatı ise 22.01.2010 tarihinde Sarıcakaya' da Sarıcailyas ve Şükranlı köyleri arasında *Pinus nigra* üzerinde (Onur Koyuncu ve Ö. Koray Yaylacı tarafından) belirlenmiştir. Örneklerin tanılanma çalışmaları geçerli literatürler (Phillips, 1981; Moser, 1983) aracılığı ile sürdürülmüş olup OBCC 1031 izolatı *Pleurotus ostreatus* olarak isimlendirilmiştir. OBCC 2002 izolatı ise geleneksel yöntemler ile isimlendirilememiştir. Bu izolatın tanılanmasına yönelik moleküler tabanlı çalışmalar başlamış durumdadır.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Statin grubu ilaçlar, çağımız hastalıklarının neredeyse en önemlisi olan kardiyovasküler hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Statinlerin ana etkisi yüksek LDL kolesterol değerlerini önemli ölçüde düşürüp, kalp damar hastalıklarının gelişimini önlemesidir. Bunun dışında kalp damar hastalığı olanlarda ise bu hastalardaki istenmeyen damar problemlerinin oluşumunu azaltması veya önlemesi en büyük avantajlarından biridir. Şekil 4.1' de kalıtsal olmayan yüksek risk hiperkolesterolemi ve kalıtsal hiperkolesterolemi hastalarında Faz IIb çalışmalarında lovastatinin plazma kolesterolü üzerinde zaman ve dozun etkisi gösterilmiştir (Tobert, 2003).



Şekil 4.1. Lovastatinin Faz IIb çalışmalarında plazma kolesterolün değişimleri. Bid; günde iki kez, gpm; günde bir kez

Statinler günümüzde hem araştırma bazında hem de piyasa bazında en ilgi çekici fungal ürünlerden birisidir. Dünya genelinde statinlerin kullanımının artması ve statinlerin kolesterol düşürücü etkilerinin yanı sıra antifungal, antitümör gibi özelliklerinin ortaya çıkarılmasıyla birlikte statinlere olan talep artmıştır (Bolego et al., 2002; Pepedil ve Güven, 2009; Barrios-González and Miranda, 2010). Bu nedenle endüstriyel farmakoloji de statinler ve statinleri üreten organizmalar önemli hale gelmiştir (Seenivasan et al., 2008). Dünyanın çeşitli ülkelerinde yüksek lovastatin

üretim yeteneğine sahip yeni makrofungus izolatlarının bulunması amacı ile bazı araştırmalar gerçekleştirilmiş olup bazı potent mikroorganizmalar belirlenmiştir (Gunde-Cimerman et al., 1993; Alarcón, 2003; Lee, 2006; Papaspyridi et al., 2007). Ancak ülkemizde statin üretimi konusundaki araştırmalar sadece bir derleme ile sınırlıdır (Erdoğrul and Azirak, 2004). Yapılan çalışmalarda *Aspergillus terreus*' un yüksek miktarlarda lovastatin üretim yeteneği olduğu rapor edilmiştir (Endo, 1979; Albers-Schonberg et al.,1981; Casas López et al., 2003; Atalla et al., 2008; Baños et al., 2009; Bizukojc et al., 2007; Barrios-González et al., 2008). *A. terreus* bu potansiyeline karşın lovastatinin biyosentez yol izinden kaynaklanan ve üretimini kısıtlayan bazı sekonder ko-metabolitler (mikotoksinler gibi) endüstriyel boyutta statin üretiminde kullanılmalarını kısıtlar. Bu durum ticari lovastatin üretiminin saflaştırma sürecinde zorluk yaratmakta ve toksisite konusunda ek analizler yapılması gibi zorunlulukları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle lovastatin üreten ancak bir mikotoksin üretmeyen suşların seçilmesi ya da geliştirilmesi, konu hakkındaki en son eğilimlerdendir. Bu amaçla statin üreten ve mümkünse yenebilir makrofungusların belirlenmesi üzerine bazı çalışmalar yapılmıştır (Gunde-Cimerman et al., 1993; Alarcón, 2003; Lee, 2006; Papasyridi et al., 2007). Makrofungusların lovastatin üretiminde zararlı olduğu düşünebilecek ko-metabolitlerin sentezlememesi özellikle büyük ölçekli üretimlerde ekonomik ve biyoteknolojik kolaylık olarak görülebilinir.

Bu çalışmada da Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümünde oluşturulan "Makrofungus Kültür Koleksiyonu"nda korunan 136 adet saf makrofungus kültürünün sekonder metabolit olan HMG Ko A redüktaz inhibitörü üretme yetenekleri belirlenmiştir. Daha sonra lovastatin üretme yeteneğine sahip 6 izolattan potansiyeli yüksek olan 2 izolat (OBCC 2002 ve OBCC 1031) sonraki çalışmalar için seçilmiştir. Bu iki izolatın farklı kültür tiplerinde lovastatin üretimi için etkili olan değişkenler ve miktarları istatiksel deney tasarımları kullanılarak araştırılmıştır. Bu şekilde seçilen izolatların fungal fermentasyonla lovastatin üretiminin optimizasyonu sağlanmıştır.

4.1. Statin üreticisi makrofungusların yarı kantitatif yöntem ile seçilmesi

Taramaya alınan 136 makrofungus izolatının statin üretim potansiyelleri araştırılmıştır. Bunun için ucuz, kolay ve aynı anda çok sayıda izolatı taramayı sağlayan Kumar et al. (2000) tarafından geliştirilen agar plak difüzyon yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan yöntemin sorunsuz biçimde çalışması, ticari statin formu ve pozitif kontrol olarak kullanılan mikroorganizmalar ile de onaylanması alınan sonuçlara güvenmemizi kolaylaştırmıştır.

Bu tarama yönteminde lovastatinlerin β-hidroksi asit formunun antifungal özelliğinden yararlanılmıştır (Macreadie et al., 2006). Lovastatinlerin β-hidroksi lakton formu suda çözünemezken, β-hidroksi asit formu suda çözünebilmektedir. Funguslar tarafından üretilen lovastatinlerin %90 kadar β-hidroksi asit formunda besiyerinde bulunmaktadır. Bu nokta da lovastatin ekstraksiyon yöntemi önemli hale gelmiştir. Üretilen olası lovastatin miktarının ekstraksiyonun da Vilches Ferrón et al. (2005) tarafından rapor edilen yöntem I daha verimli bulunmuştur. Agar disk difüzyon yönteminde test mikroorganizmalarının inhibisyonunda daha büyük zon vermesi, olası statini daha fazla miktarda ekstrakte ettiğini göstermiştir. Bu nedenle sonraki zamanlarda konu hakkında yapılacak araştırmaklarda bu ekstraksiyon yönteminin verimli biçimde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.

Yapılan bazı çalışmalarda lovastatinin bazı konsantrasyonlarının çeşitli fungal organizmaların büyümesini inhibe ettiği rapor edilmiştir (Macreadie et al., 2006). Bununla birlikte *Neurospora crassa*' nın , β-hidroksi asit formuna karşı diğer fungal organizmalardan daha duyarlı olduğu bilinmektedir (Kumar et al., 2000). *Neurospora crassa*' nın duyarlılığı az miktarda statin üretimini bile belirleme avantajı sağlamıştır. Bu çalışma da bu nedenle *N.crassa* ve *C. albicans* olmak üzere iki farklı test mikroorganizması kullanılarak büyümelerinin inhibisyonu ile zon oluşumu gözlenmiştir. Yapılan tarama çalışması sonucunda 136 izolattan pozitif kontrol suşlarıyla birlikte 15' inin lovastatin üretme yeteneğine sahip olabileceği belirlenmiştir.

4.2. Statin üretiminin onaylanması

Agar plak disk difüzyon çalışmasında pozitif sonuç veren 15 izolattan elde edilen ekstraktlarda antifungal özelliğe sahip bileşik ya da bileşiklerin lovastatin olup olmadığı ince tabaka kromotografisi (İTK) yöntemiyle belirlenmiştir. İnce tabaka kromatografik analizde hareketli faz olarak kullanılan çözücüler ile konsantrasyonları yöntemin güvenilirliğini ve duyarlılığını belirler. Bazı çalışmalarda metanol ile lovastatin ekstraksiyonundan elde edilen ekstraktları kullanılarak ince tabaka analizi yapılmıştır. Ancak metanol β-hidroksi asit formunu yapısal olarak değiştirdiğinden sonuç alınamamıştır (Gunde-Cimerman et al., 1993; Shindia, 1997). Bu çalışma da ekstraksiyon sıvısı olarak lovastatinin iyi çözündüğü bilinen etil asetat kullanılmıştır. Bu nedenle ince tabaka kromatografisinde kullanılmak üzere içerisinde etil asetatın farklı konsantrasyonları bulunan iki farklı hareketli fazın Rf değerleri belirlenerek lovastatin için uygun hareketli faz belirlenmiştir. Çözücü polaritesinin iyi olmasından dolayı yüksek Rf değeri veren hareketli faz A (Diklorametan: etil asetat, 60:40, (v/v)) tercih edilerek ekstraktların İTK analizi yapılmıştır. Lovastatin standardının Rf değeri 0,85 olarak bulunmuş ve fungal ekstraktlarının Rf değerleri karşılaştırılmıştır. Böylece, tarama aşamasında agar disk difüzyon yönteminde inhibisyon zonu veren ve statin üretiminden şüphe edilen 11 ekstraktan 6 tanesinde lovastatin olduğu ve dolayısı ile inhibisyonun lovastatin kaynaklı olduğu onaylanmıştır. Bunlardan OBCC 2001 (Lenzites betulina), OBCC 2002 (tanımlanmamış izolat), OBCC 1031 (*P. ostreatus*), OBCC 5022 (*Trametes versicolor*), OBCC 5023 (*Trametes versicolor*) *P. chrysosporium* ME 496 pozitif sonuç, OBCC 03 (*Ganoderma* sp.), OBCC 06 (*Clavariadelphus truncatus*), OBCC 23 (*Pycnoporus cinnabarius*), OBCC 5008 (*Ganoderma lucidum*), OBCC 5039 (*Ganoderma sp.*) negatif sonuç vermiştir. İnce tabaka kromatografisinde negatif sonuç veren izolatların zon vermesinin nedeni bu izolatların antifungal özelliğe sahip lovastatin dışında bileşikler (ganoderik asit, vanillik asit, klaverik asit gibi) üretebilmeleri olduğu düşünülmüştür.

En yüksek lovastatin üreticisini bulmak üzere yapılan birçok çalışma vardır. Literatür incelendiğinde bu çalışmalarda *Aspergillus terreus*' un lovastatin üretim yeteneği öne çıkmaktadır (Endo, 2004). Shindia tarafından 1997 yılında Mısır toprağından izole edilmiş 25 filamentöz fungusun mevinolin üretim potansiyelini

araştırılmıştır. Bu çalışma ile *Aspergillus oryzae, A. terreus, Doratomyces stemonitis, Paecilomyces vatioti, Penicillium citrinum, P. chrysogenum, Scopulariopsis brevicaulis* ve *Trichoderma viridae*' nin mevinolin ürettiğini belirlemiştir. Bununla birlikte *A. chrysogenum, A. fisheri, A. flavus, A. umbrosus, A. parasiticus, P. funiculosum, T. viridae, T. longibrachiatum* (Manzoni and Rollini, 1993; Samiee et al., 2003), *P. ostreatus, P. eryngii, P. djamor, P. salignus* (Alarcón et al., 2003)*, Pleurotus pulmonarius, Trametes versicolor, Agrocybe aegerita, Agaricus bisporus* (Gunde-Cimerman et al., 1993), *Monascum ruber* (Manzoni et al., 1999; Chang et al., 2002), *Monascus pilosus* (Miyake et al., 2006) bazı halofilik fungusların (Vaupotič et al., 2008) ve aktinomisetlerin (Srinu et al., 2010) statin üretim yetenekleri ortaya konulmuştur.

4.3. Statin üretiminin optimizasyonu

Çalışmanın bu aşamasına kadar taranan izolatların ekstraktların olası statinin yarı kantitatif analizi (agar plak difüzyon yöntemi ile zon oluşumunun gözlenmesi) sonucu elde edilen pozitif izolatların bazılarında lovastatinin varlığı ince tabaka kromatografisiyle onaylanmıştır. İTK analizinde pozitif sonuç veren izolatların hangisinin yüksek lovastatin üretme potansiyeline sahip olduğu ise zon çaplarının hesaplanmasıyla bulunan olası lovastatin miktarlarıyla belirlenmiştir. İTK analizinde pozitif sonuç verip olası lovastatin miktarı yüksek olan OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatlarının lovastatin üretimi için etkin kültür yöntemleri belirlenmiş ve optimizasyonları gerçekleştirilmiştir.

Ticari lovastatin üretiminde kullanılan *Monascus* türleri tarafından üretilen sitrinin ve *Aspergillus* türleri tarafından üretilen aflotoksin, lovastatin üretiminde en önemli ko-metabolit toksinlerdir. Bu durum ticari lovastatin üretim sürecinde saflaştırma sürecinde zorluk yaratmakta ve toksisite konusunda ek analizler yapılması gibi zorunlulukları beraberinde getirmektedir. Bu nedenle lovastatin üreten ancak bir mikotoksin üretmeyen suşların seçilmesi ya da geliştirilmesi, konu hakkındaki en son eğilimlerdendir (Ganrong et al., 2005; Tsukahara et al., 2009).

Lovastatin üretiminde çeşitli toksik metabolitlerin yanı sıra bazı tıbbi ve ticari öneme sahip metabolitlerin de (pigment, itakonik asit, geodin gibi) üretildiği bilinmektedir (Huang et al., 2006; Lai et al., 2007; Kasetsart, 2009). Yapılan bazı

çalışmalarda da lovastatinle birlikte üretilen γ-Aminobütirik asitin (GABA) çok fonksiyonlu diyet desteği üretimi amaçlanmıştır (Rajasekaran et al., 2009). Chen ve arkadaşları (2010) tarafından yapılan çalışmada *Cordyceps sinensi* ve *Agaricus blazei*' nin misel ve *Agaricus bisporus*' un şapka formunun yüksek miktarlarda lovastatin ve GABA içerdiği rapor edilmiştir. Katı faz fermentasyonunda lovastatin üretimi için substrat olarak kullanılan buğday kepeğinin nem miktarı % 65 olduğunda nigerloksin, %70 olduğunda siklosporin C ve mikofenolik asit üretildiği bilinmektedir (Chen et al., 2010). Bu bileşikler klasik tarama yöntemleriyle belirlenebilir ve ko-metabolitlerle lovastatin üretiminin arttırılması sağlanabilir. Bu çalışmada da bu amaçla hem toksik ko-metabolit üretim ihtimali az olan/olmayan hem de hazır besin kaynağı olarak kullanılan bazı makrofungusların statin üretim yetenekleri araştırılmıştır.

Birçok sekonder metabolitin üretiminde olduğu gibi lovastatin üretimi de farklı kültür tipleri ile farklı kimyasal ve fiziksel kültür koşuları (pH, sıcaklık, besiyeri içeriği, inokulum) tarafından etkilenmektedir. Bu nedenle de yüksek ürün elde etmek için her parametrenin optimizasyonu yapılmalıdır. Ancak bu değişkenlerin etkisinin tek tek araştırılması çalışmanın hem maliyetini hem de süresini olumsuz yönde etkiler. Bu nedenle bazı istatiksel deney tasarımları geliştirilmiştir. Günümüzde enzim, antibiyotik gibi birçok sekonder metabolit üretiminin optimizasyonunda istatiksel tasarımlar kullanılmaktadır. Son zamanlarda *A. terrus* tarafından yüksek lovastatin üretimini sağlamak amacıyla da Plackett-Burman ve cevap yüzey metodu tasarımları kullanılmaktadır. Bu çalışmada da Plackett-Burman deney tasarımı ile OBCC 2002 ve 1031 izolatları tarafından lovastatin üretimini arttıran koşullar (karbon kaynağı tipi, azot kaynağı tipi, mineral madde tipi vb.), cevap yüzey metodu ile de bu değişkenlerden etkili olanların etkin konsantrasyonları başarılı biçimde belirlenmiştir. Çalışmaların sonunda modellerden öngörülen değerler ile deneyler sonucu gözlenen değerler arasında lineer ilişkinin olduğu, diğer bir deyişle ölçülen tepkilerin reaksiyon parametrelerinin birbiriyle ilişkisini başarılı bir şekilde temsil ettiği görülmüştür (Panda et al., 2008; Pansuriya and Singhal, 2010). OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatlarının katı faz fermentasyonunda PB ve RSM tasarımlarının uygulanması sonuncunda üretilen lovastatin miktarlarının optimize edilmeden önceki lovastatin miktarlarından yaklaşık 70 kat daha fazla olduğu görülmüştür. Bu nedenle bu yöntemleri sonraki çalışmalarda istatistiksel deney tasarımı uygulayacak araştırmacılara da öneriyoruz.

Fermentasyon sonucu elde edilen ekstraktlardaki lovastatin tayini β-hidroksi asit formu üzerinden yapılarak HPLC ile analiz edilmiştir. Çünkü kromatografik kolonda β-hidroksi lakton formunun aksine β-hidroksi asit formu hareketli fazla daha iyi uyum göstermektedir. HPLC metodu kolay, güvenilir, miktar tayini yapılabilinir ve GC/MS, LC/MS gibi diğer yöntemlere göre daha ekonomiktir (Vuletić et al., 2005; Manzoni and Rollini, 2006; Nirogi et al., 2007). Elde edilen fungal ekstraktlardaki statinin HPLC ile analizi sonucunda lovastatin piki dışında farklı pikler elde edilmiştir. Bunların bazıları lovastatin pikinden uzakta bazıları ise yakınında görülmüştür. Lovastatin pikine yakın olan piklerin lovastatin biyosentezinde yer alan basamaklarda üretilen ara metabolitler (Manzoni et al., 1998) veya küçük modifikasyonlarla üretilen farklı statin formları (Zhuge et al., 2008) olabileceği düşünülmektedir.

Makrofungus izolatları OBCC 2002 ve OBCC 1031 için Plackett-Burman deney tasarımı ile katı faz fermentasyonu için lovastatin üretimini etkileyebileceği düşünülen katı substrat, bu substratın partikül boyutu, ilave karbon ve azot kaynağı, mineral isteği parametre olarak değerlendirilmiştir. Yapılan çoğu çalışma da lovastatin üretimi için optimal pH' nın 5-6 sıcaklığın 28 ˚C ve inkübasyon süresinin 6-7 gün olduğu belirlenmiştir (Shindia, 2001; Sayyad et al., 2007; Jaivel and Marimuthu, 2010). Bu çalışmada literatürde genel geçerliği kabul edilmiş olan bu parametreler sabit tutularak diğer parametreler üzerinde çalışılmıştır.

Katı substrat olarak buğday kepeği, arpa, pirinç kavuzu, mısır ve yulaf kullanılmıştır. OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatlarının lovastatin üretiminde PB analiz sonuçlarına göre literatürde yaygın olarak etkili olduğu düşünülen buğday kepeğinin (Ahamad et al., 2006; Jaivel and Marimuthu 2010) aksine arpanın etkili olduğu görülmüştür. Bununla birlikte Valera et al., (2005) tarafından yapılan çalışmada ise buğday kepeği-arpa karışımında da lovastatin miktarının arttığı rapor edilmiştir. Katı faz fermentasyonunda substrat olarak pirincin, *Monascus* türlerinin lovastatin üretimi üzerine artırıcı etkisi (11 mg/g) olduğu rapor edilmiştir (Xu et al., 2005). Birçok çalışma da araştırılan mikrofunguslar (*Aspergillus terreus* ve *Monascus ruber*) genellikle katı substrat olarak buğday kepeğinde, bu çalışma da kullanılan makrofungus izolatları ise bilinenin aksine arpada yüksek lovastatin üretimi gözlenmiştir.

Plackett-Burman deney tasarımı ile katı faz fermentasyonunda OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatları için katı substrat olarak arpanın ve arpa boyutunun lovastatin

üretiminde etkili olduğu ancak OBCC 1031 izolatının OCC 2002' den farklı olarak lovastatin üretiminde ilave azot (yeast ekstrakt) kaynağına da ihtiyaç duyduğu görülmüştür. Partikül boyutu 1-2 mm olan 5 g arpa ile yapılan katı faz fermentasyonunda OBCC 2002 izolatının 0.263 mg/g biyomasıyla 139.455 mg/g lovastatin üretimi sağlanmıştır. OBCC 1031 izolatının, partikül boyutu 0.5-1 mm olan 8 g arpa ve ilave 0.5 % yeast ekstrakt besiyeri içeriği ile yapılan katı faz fermentasyonunda 0.132 mg/g fungal biyomas ile en fazla 34.968 mg/g lovastatin ürettiği belirlenmiştir. Katı substratın yüzey alan büyüklüğünü, ısı ve oksijen dağılımını sağlayan partikül boyutunun da lovastatin üretiminde önemli bir parametre olduğu görülmüştür. OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatlarının katı faz fermentasyonu ile lovastatin üretiminde mineral çözeltinin ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/l, $ZnSO_4 \cdot 4H_2O$ 3.4 mg/l, NaCl 0.5 g/l, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 mg/l, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 2 mg/l ve $MnSO_4$ 1.6 mg/l) arttırıcı etkisi olmamıştır. Yapılan bir çalışmada *A.terreus* için divalent metal katyonlarının (Fe^{+2},Ca^{+2}, Zn^{+2}, Mg^{+2}, Cu^{+2} ve Mn^{+2}) fungal büyüme ve lovastatin üretimi üzerine etkisi araştırılmıştır. Fe^{+2} ve Zn^{+2} ' nun lovastatin biyosentezinde yer alan anahtar enzim görevi yapan Lov D ve Lov F' nin üretilmesinde önemli olduğunu, derin kültür fermentasyon ortamında Zn^{+2}' nun 2-5 mM varlığında 49.2 mg/g lovastatin üretimi rapor edilmiştir (Jia et al., 2010). OBCC 2002 izolatının lovastatin üretiminde ilave karbon (laktoz) ve azot (yeast ekstrakt, malt ekstrakt) kaynağının önemli bir etkisi görülmemiştir. Katı faz fermentasyon ortamında OBCC 1031 izolatının lovastatin üretiminde azot kaynağı olarak yeast ekstrakta ihtiyaç duyduğu belirlenmiştir. Katı faz fermentasyonu ile *Penicillium brevicompactum* WA 2315 ile kompaktin üretiminde buğday kepeğine ile 0.678 mg/g, ilave edilen maltodekstrin ile 0.85 mg/g kompaktin üretildiği rapor edilmiştir (Shaligram et al., 2009).

Katı fermentasyonu ile lovastatin üretimi üzerine yapılan bazı çalışmalarda üretilen lovastatin miktarları Çizelge 4.1' de verilmiştir. Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi sırasıyla *M. purpureus* ile 193.7 mg/g (Subhagar et al., 2009), bu çalışmada OBCC 2002 ile 139.45 mg/g, *A.terreus* ile 138.4 mg/g (Jaivel and Marimuthu, 2010) lovastatin elde edilmiştir. *Pleurotus ostreatus* OBCC 1031 izolatının katı faz fermentasyonu ile üretilen lovastatin miktarı da aynı tür ile yapılan diğer çalışmalardan öne çıkmaktadır.

Çizelge 4.1. Katı faz fermentasyonu ile üretilen lovastatin miktarları

İzolat	Lovastatin miktarı (mg/g)	Referans
Agaricus blazei	0.77	Chen et al., 2010
Aspergillus flavipes	16.65	Valera et al., 2005
Aspergillus terreus	20	Barrios-González et al.,2008
	7.5	Banos et al., 2009
	0,982	Jaivel and Marimuthu, 2010
	138.4	
	2.96	Pansuriya and Singhal, 2010
Cordyceps sinensis	1.365	Chen et al., 2010
Laetiporus sp.	0.037	Aryantha et al., 2007
	0.18	Aryantha et al., 2010
Monascus kaoliang KB9	11	Chayawat et al., 2009
Monascus pilosus NBRC4520	0.225	Tsukahara et al., 2009
Monascus purpureus CCRC 31615	0,378	Su et al., 2003
Monascus purpureus MTCC 369	193.7	Subhagar et al., 2009
	3.420	Panda et al., 2009
Penicillium brevicompactum WA 2315	0,95	Shaligram et al., 2009
Pleurotus ostreatus	0.606	Chen et al., 2010
Pleurotus ostreatus (Şapka)	0.216	
Pleurotus ostreatus OBCC 1031	34,968	Bu çalışmada
OBCC 2002	139,45	

Yapılan bazı çalışmalarda katı substratın miktarı arttıkça üretilen lovastatin miktarının artmadığı rapor edilmiştir (Casas López et al., 2004; Valera et al., 2005). Bu çalışmada katı faz fermentasyonunda en yüksek lovastatin miktarı OBCC 1031 izolatı için 8 g, OBCC 2002 izolatı için 5 g arpa kullanıldığında elde edilmiştir. Bu farklılığın nedeni farklı organizmaları farklı ihtiyaçlarından kaynaklandığı gibi lovastatin üretiminin geri beslemeli inhibisyonla kontrol edilmesi olabileceği düşünülmektedir. Ortamdaki lovastatin miktarı belirli bir seviye ulaştıktan sonra lovastatin kendi üretimini inhibe ederek durdurabildiğinden substrat miktarı arttıkça lovastatin miktarında artış gerçekleşmeyebilir. Lovastatinlerin kendi üretimini inhibe etme özelliği nedeniyle büyük ölçekli üretimde büyük bir dezavantaja sahiptirler. Ancak bazı araştırmalarda antibiyotik, vitamin destekli fermentasyonlarda lovastatin üretiminin geri beslemeli

inhibisyonu engellenerek lovastatin üretimi artırılmıştır (Bizukojc et al., 2007; Jia et al., 2010). Ayrıca katı faz fermentasyonu reaktörlerinde, ürün oluşumu sonucu ortaya çıkan metabolik ısının uzaklaştırılması, mikroorganizmanın oksijen ihtiyacının karşılanması (havalandırma), homojen karışımı, bölgesel farklılık gösteren pH gibi parametrelerin değerlendirilmesinde dezavantajlara sahiptir. Ancak geliştirilen yeni stratejilerle bu dezavantajlar elimine edilmektedir (Lai et al., 2004; 2005).

Makrofungus izolatları OBCC 2002 ve OBCC 1031 için Plackett-Burman deney tasarımı ile derin kültür fermentasyonu için lovastatin üretimini etkileyebileceği düşünülen karbon ve azot kaynakları, mineral isteği, karıştırma hızı parametre olarak değerlendirilmiştir. Karbon kaynağı olarak laktoz, glikoz, gliserol ve maltoz kullanılmıştır. OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatlarının lovastatin üretiminde PB analiz sonuçlarına göre literatürde yaygın olarak etkili olduğu düşünülen laktozun (Valera et al., 2005; Lai et al., 2007) aksine glikozun daha etkili olduğu görülmüştür. Lovastatin üretiminde en az/azaltıcı etkili karbon kaynaklarının OBCC 2002 izolatı için maltoz OBCC 1031 izolatı için laktoz ve gliserol olduğu belirlenmiştir (Bkz. Çizelge 3.7; Çizelge 3.15). OBCC 2002 izolatı için azot kaynağı olarak peptonun lovastatin üretimini etkili iken OBCC 1031 izolatı için yeast ekstraktın etkili olduğu belirlenmiştir. Lovastatin üretiminde C:N oranın önemli ve etkili olduğu bazı çalışmalarda rapor edilmiştir (Lai et al., 2007). Bu çalışmada da her iki izolatın lovastatin üretiminin yüksek olduğu besiyerlerinde C:N oranın korunduğu görülmüştür.

Son zamanlarda lovastatin üretimi ile ilgili yapılan çalışmalarda katı faz fermentasyonun derin kültür fermentasyonuna oranla 10 kat daha fazla ürün elde edildiği belirtilmiştir (Baños et al., 2006). Buna ilişkin bazı moleküler çalışmalar da yapılmıştır. Katı faz fermentasyonunda kullanılan ortama adaptasyon genlerin ekspresyonunun derin kültür fermentasyon ortamınınkinden 5 kat daha hızlı olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte lovastatin biyosentez yol izi genlerinin ekspresyonunda hızlı gerçekleştiği belirlenmiştir (Barrios-González et al., 2005; 2008). Bununla birlikte morfolojinin lovastatin üretimi etkileyen önemli faktörlerden biri olduğu bilinmektedir. Makrofunguslar derin kültür fermantasyonunda pellet, katı faz fermantasyonunda ise doğadaki büyümelerine benzer biçimde miselyal olarak büyürler. Lovastatin üretiminin, oksijen konsantrasyonu ile fungal morfolojiye bağlı değişkenlik gösterdiği rapor edilmiştir (Porcel et al., 2006). Bu çalışmada da OBCC 1031 izolatının

200 rpm çalkalamalı derin kültür fermentasyonunda daha yüksek lovastatin üretimi görülmüştür.

Çizelge 4.2. Derin kültür fermentasyonu ile üretilen lovastatin miktarları

İzolat	Lovastatin miktarı (mg/l)	Referans
Aspergillus terreus ATCC 20542	84	Shindia, 1997
	256	Manzoni et al., 1998
	110	Shindia, 2001
	~ 40	Casas López et al., 2003
	230	Casas López et al., 2004
	60	Vilches Ferrón et al., 2005
	186	Porcel et al., 2006
	300	Manzoni and Rollini, 2006
	873	Lai et al., 2007
	0.65	Barrios-González et al., 2008
	49.2	Jia et al., 2010
	952.7	
Lentinus edodes	2.34	Lee et al., 2006
Monascus pilosus	444	Miyake et al., 2006
	725	
Monascus purpureus MTCC 369	0.318	Sayyad et al., 2007
	737	Ahmad et al., 2010
	97.5	Subhagar et al., 2009
Monascus ruber	131	Chang et al., 2002
	157	
Penicillium citrinum	4.2	Endo et al., 1976
	400	Konya et al., 1980
	589.3	Ahmad et al., 2010
Pleurotus ostreatus	21.9	Lee et al., 2006
Pleurotus eryngii	1.74	
Pleurotus ostreatus	43	Alarcón et al., 2006
Pleurotus ostreatus ATHUM 4438	1.3	Papaspyridi et al., 2007
Pleurotus ostreatus OBCC 1031	114,81	Bu çalışmada
OBCC 2002	12,51	

Günümüzde lovastatin üretimini artırmak amacıyla bir takım stratejiler geliştirilmiştir. Baños et al., (2009) lovastatin üretimini artırmak için katı faz fermentasyonunda tutuklama yöntemiyle 7 günde 19.95 mg/g lovastatin üretmeyi

sağlamıştır. Ancak lovastatin üretiminde tutuklama yönteminin özellikle fungusun ve metabolitin özelliklerine göre performansının değiştiğini bildirmiştir (Barrios-González et al., 2008; Baños et al., 2009). Bunun yanı sıra lovastatin üretme yeteneği olan mikroorganizmaların çeşitli yollarla mutant edilerek oluşturulan suşların statin üretme yeteneklerinin de arttığı rapor edilmiştir (Jaivel and Marimuthu 2010). Bu ve benzer yöntemler ile bilinen ve/veya ticari fungus suşları ile lovastatin üretimini arttırmaya yönelik stratejiler konusuna yoğun ilgi vardır. Ancak bilinmeyen ve yeni fungal izolatların farmakolojik sektöre kazandırılmasına yönelik çalışmalar da bir yandan ve hızla artmaktadır. Bu yönelimin bir parçası olarak bu çalışma da yeni potent lovastatin üreticisi fungal suşların eldesi ve üretim koşullarının optimizasyonuna yöneliktir.

Sonuç olarak bu çalışmada, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü bünyesinde oluşturulmuş bulunan "Basidiomycetes Kültür Koleksiyonu"nda bulunan 136 makrofungus izolatının lovastatin üretme potansiyelleri belirlenmiştir. İstatiksel tasarımlar yardımıyla OBCC 2002 ve OBCC 1031 izolatlarının lovastatin üretiminde etkili olan kültür tipi belirlenmiş ve fungal fermentasyonla lovastatin üretiminin optimizasyonu yapılmıştır. Lovastatin üretiminin organizmaya bağlı olarak farklı kültür tiplerinde değiştiği görülmüştür. Bu amaçla farklı organizmalardan farklı tasarımlarla oluşturulan kültür yöntemleri ile daha fazla lovastatin üretimi sağlanabilir. Özellikle büyük ölçekte lovastatin üretimi, üretilen statinin etkinliği ve biyotransformasyonu çalışmanın sonraki olası yönelimleri arasında olmaya değer önemde görülmektedir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

Adrio, J. L. and Demain, A. L., 2003. Fungal biotechnology. International Microbiology, 6(3):191-199.

Ahamad, M. Z., B. P. Panda, S. Javed and M. Ali, 2006. Production of mevastatin by solid-state fermentation using wheat bran as substrate. Res. J. Microbiol., 1: 443-447.

Ahmad, A., Panda, B. P., Mujeeb, M., 2010. Screening of nutrient parameters for mevastatin production by *Penicillium citrinum* MTCC 1256 under submerged fermentation using the Plackett-Burman design. J Pharm Bioall Sci;2:44-6.

Aktürk, O., 2006. Hiperkolesterolemi oluşturulan ratlarda statinlerle tedavinin hipokampal NMDA reseptörü subunitelerine etkisi. Süleyman Demirel Üniversitesi, Tıpta Uzmanlık Tezi.

Alarcón, J., Àguila, S., Arancibia-Avila, P., Fuentes, O., Zamorano-Ponce, E., Hernández M., 2003. Production and Purification of statins from *Pleurotus ostreatus* (Basidiomycetes) strains. Z. Naturforsch. 58c, 62-64.

Albers-Schonberg, G., Joshua, H., Lopez, M. B., Hensens, O. D., Springer, J. P., Chen, J., Ostrove, S., Hoffman, C. H., Alberts, A. W. and Patchett, A. A. 1981. Dihydromevinolin, A potent metabolite produced hypocholesterolemic by *Aspergillus terreus*. J Antibiot. 39: 507-512.

Alberts, A.W., Chen, J., Kuron, G., Hunt, V., Huff, J., Hoffman, C., J. Rothrock, Lopez M., Joshua, H., Harris E., Patchett, A., Monaghan R., Currie S., Stapley E., Albers-Schonbergy, G., Hensens, O., Hırshfieldt, J., Hoogsteent, K., Liescht J., and Springer, J., 1980. Mevinolin: A highly potent competitive inhibitor of hydroxymethylglutaryl-coenzyme A reductase and a cholesterol-lowering agent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 77, No. 7, p. 3957-3961.

Aryantha, I. N. P. and Sidharta, M., 2007. Lovastatin production by *Laetiiporus* sp. {Bull. Ex. Fr.} Bond et Sing. in various solid substrates. Proceedings of the Asian Mycological Congress, Dec. 2-6, Penang Malaysia, pp: 58-58.

Aryantha, I.N.P., Kusmaningati, S., Sutjiatmo, A.B., Sumartini, Y., Nursidah, A.and Narvikasari, S., 2010. The effect of *Laetiporus* sp. (Bull. ex Fr.) bond. et sing. (polyporaceae) extract on total blood cholesterol. Biotechnology, 9: 312-318.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Askenazi, M., Driggers, E. M., Holtzman, D. A., Norman, T. C., Iverson, S., Zimmer, D. P., Boers, M. E., Blomquist, P. R., Martinez, E. J., Monreal, A. W., Feibelman, T. P., Mayorga, M. E., Maxon, M. E., Sykes, K., Tobin, J. V., Cordero, E., Salama, S. R., Trueheart, J., Royer, J. C., Madden, K. T., 2003. Integrating transcriptional and metabolite profiles to direct the engineering of lovastatin-producing fungal strains, Nature Biotechnology, 21,150-6.

Atalla, M. M., Hamed, E. R. and El-Shami, A. R., 2008. Optimization of a culture medium for increased mevinolin production by *Aspergillus terreus* strain. Malaysian Journal of Microbiology, Vol 4(2) p. 6-10.

Barrios-González, J., Baños, J. G., Covarrubias, A. A. and Garay-Arroyo, A., 2008. Lovastatin biosynthetic genes of *Aspergillus terreus* are expressed differentially in solid-state and in liquid submerged fermentation. Appl Microbiol Biotechnol 79: 179–186.

Barrios-Gonzàles, J., Fenàndez, F. J., Tomasini, A., Mejia, A., 2005. Secondary Metabolites Production by Solid State Fermentation. Malaysian Journal of Microbiology Vol1(1) p 1-6.

Baños, J. G., Mejia, A., & Barrios-Gonzdlez, J., 2006. Rational selection methods to obtain mutants that overproduce lovastatin in solid-state fermentation or in liquid submerged fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, Volume 79, Number 2, 179-186.

Barrios-González, J. and Miranda, R. U., 2010. Biotechnological production and applications of statins. Appl. Microbiol. Biotechnol. 85, 869–883.

Baños J., G., Tomasini, A., Szakács, G. and Barrios-González, J., 2009. High lovastatin production by *Aspergillus terreus* in solid-state fermentation on polyurethane foam: An artificial inert support. Journal of Bioscience and Bioengineering. Vol. 108, No. 2, 105–110.

Baños, J. G., Tomasini, A., Szacaks, G. & Barrios-Gonzdlez, J., 2006. Lovastatin production by solid-state fermentation on artificial inert support. Current Developments in Solid-State Fermentation.

Bizukojc, M., Ledakowicz, S., 2007. A macrokinetic modelling of the biosynthesis of lovastatin by *Aspergillus terreus*. Journal of Biotechnology 130; 422–435.

Bizukojc, M., Ledakowicz, S., 2008. Biosynthesis of lovastatin and (+)-geodin by *Aspergillus terreus* in batch and fed-batch culture in the stirred tank bioreactor. Biochemical Engineering Journal 42 198–207.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Bizukojc M., Pawlowska B., Ledakowicz S., 2007. Supplementation of the cultivation media with B-group vitamins enhances lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus*. Journal of Biotechnology 127; 258–268.

Bolego, C., Poli, A., Cignarella, A., Catapano, A. L., and Paoletti, R., 2002. Novel Statins: Pharmacological and Clinical Results Cardiovascular Drugs and Therapy 16 251–257.

Cabral, M. E., Delgado, O. D., Sampietro, D.A., Catalan, C.A., Figueroa, L.I.C. and Farina, J.I., 2010. Antifungal activity and the potential correlation with statin-producing ability: An optimized screening applied to filamentous fungi from las yungas subtropical rainforest. Res. J. Microbiol., 5: 833-848.

Campbell, C. D. and Vederas, J. C., 2010. Biosynthesis of lovastatin and related metabolites formed by fungal iterative PKS enzymes. Biopolymers, 93, 755-763.

Casas López, J. L., Sànchez Pèrez, J. A., Fernàndez Sevilla, J. M., Acièn Fernàndez, F. G., Molina Grima, E., Chisti, Y., 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: effects of the C:N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. Enzyme Microb. Technol. 33, 270–277.

Casas López, J. L., Sànchez Pèrez, J. A., Fernàndez Sevilla, J. M., Rodrìguez Porcel, E. M., Chisti, Y., 2004. Lovastatin inhibits its own synthesis in *Aspergillus terreus* J Ind Microbiol Biotechnol 31: 48–50.

Casas López, J. L., Sànchez Pèrez, J. A., Sevilla, J. M. F., Fernàndez, F. G. A. and Chisti, Y., 2004. Fermentation optimization for the production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: use of response surface methodology. J Chem Technol Biotechnol 79:1119–1126.

Casas López, J. L., Sànchez Pèrez, J. A., Fernàndez Sevilla, J. M., Rodrìguez Porcel, E. M., Chisti, Y., 2005. Pellet morphology, culture rheology and lovastatin production in cultures of *Aspergillus terreus*. Journal of Biotechnology 116 61–77.

Chakravarti, R., Sahai, V., 2002. Optimization of compactin production in chemically defined production medium by *Penicillium citrinum* using statistical methods. Process Biochemistry. 38: 481-486.

Chakravarti, R., Sahai, V., 2002. A chemically-defined medium for production of compactin by *Penicillium citrinum* Biotechnology Letters 24: 527–530.

Chakravarti, R., Sahai, V., 2004. Compactin—a review. Appl.Microbiol.Biotechnol. 64: 618–624.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Chang, C., Chen, W., Ho, T., Wu, H., Wei, Y., 2011. Development of natural anti-tumor drugs by microorganisms. J Biosci Bioeng.

Chang, Y. N. , Lin, Y. C., Lee, C. C., Liu, B. L., Tzeng, Y. M., 2002. Effect of Rice-Glycerol Complex Medium on the Production of Lovastatin by *Monascus ruber*. Folia Microbiol. 47 (6), 677-584.

Chayawat, J., Jareonkitmongkol, S., Songsasen, A., Yongsmith, B., 2009. Pigments and anti-cholesterol agent production by *Monascus kaoliang* KB9 and its color mutants in rice solid cultures. Kasetsart Journal, Natural Sciences Vol. 43 No. 4 p. 696-702.

Chen S., Tsai,C., Hsieh Y., Wang, L., Mau J., 2010. Lovastatin and γ-aminobutyric acid contents in mushroom fruiting body and mycelia. Food Chemistry. 289-24.

Cihangir, N., 2002. Stimulation of the gibberellic acid synthesis by *Aspergillus niger* in submerged culture using a precursor. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 18(8): 727-729.

Cox, R., 2007, Polyketides, proteins and genes in fungi: programmed nano-machines begin to reveal their secrets. Org. Biomol. Chem., 2007. 5, 2010-2026.

Cox, R. J. and Simpson, T. J., 2009. Fungal type I polyketide synthases. Methods Enzymol. 459: 49-78.

David, J. Maron, Sergio Fazio and MacRae F., 2000. Linton.Current Perspectives on Statins. Circulation, 101: 207-213.

Desgranges, C., Vergoignan, C., Georges, D.A., 1991. Biomass estimation in solid fermentation. Applied Microbiology and Biotechnology, 35, 200-205.

Endo, A. 1979. Monacolin K, A New Type of Cholesterolemic Agent Produced by a *Monoacus* Species. Journal of Antibiotics. 32(8): 852-854.

Endo, A., 2004. The origin of the statins. International Congress Series 1262, 3 – 8.

Endo, A., 2010. A historical perspective on the discovery of statins. Proc. Jpn. Acad., Ser. B 86 484-493.

Endo, A., Hasumi, K., 1985. Dihydromonacolin L and Monacolin X, new metabolites those inhibit cholesterol biosynthesis. J Antibiot (Tokyo) 38:321–327.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Enman, J., 2007. Production and quantification of eritadenine, a cholesterol reducing compound in shiitake (Lentinus edodes). Licentiate thesis,26.

Erdoğrul Ö. ve Azirak, S., 2004. Review of the studies on the red yeast rice (*Monascus purpureus*), Turkish Elec. J. of Biot., 2, 37–49.

Friedrich, J., M. Zuzek, M. Bencina, A. Cimerman, A. Strancar and I. Radez., 1995. High-performance liquid chromatographic analysis of mevinolin as mevinolinic acid in fermentation broths. J. Chromatogr. A, 704: 363-367.

Fritz, G., Henninger, C. and Huelsenbeck, J., 2011. Potential use of HMG-CoA reductase inhibitors (statins) as radioprotective agents. Br Med Bull doi: 10.1093/bmb/ldq044

Frost, F. J., Peterson, H., Tollestrup, K., Skipper, B., 2007. Influenza and COPD mortality protection as pleiotropic, dose-dependent effects of statins. Chest., 131:1006–1012.

Ganrong, X., Yue, C., Yun, C., Xiaorong, L., Xing, L., 2005. Production of monacolin K in solid-state fermentation of Monascus sp. 9901 that does not produce citrinin. Key Laboratory of Industrial Biotechnology of Ministry of Education, School of Biotechnology in Southern Yangtze University, Wuxi, 214036, Jiangsu, China. www.plantpro.doae.go.th/worldfermentedfood/p16_xu.pdf.

Gaw, A., 2001. Statins in General Practice, Matin Dunitz Ltd., p: 76.

Gomes, A. M. P., and Malcata F. X., 1998. Develpoment of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. J. Dairy Sci. 81:1492–1507.

Gunde-Cimerman, N., Friedrich, J., Cimerman, A. and Benicki, N., 1993. Screening fungi for the production of an inhibitor of HMG CoA reductase: Production of mevinolin by the fungi of the genus *Pleurotus*. FEMS Microbiol. Lett. 111: 203-206.

Gunde-Cimerman, N., Plemenitas A., and Cimerman, A., 1993. *Pleurotus* fungi produce mevinolin, an inhibitor of HGM CoA reductase. FEMS Microbiol. Lett. 133:333–338.

Güleç, S., 2007. Statinlerin Etkinliği. Türk Kardiyol Dern Arfl - Arch Turk Soc Cardiol. 35 Suppl 1:8-14.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Hajjaj, H., Duboc, P., Fay, L. B., Zbinden, I., Macè, K., Niederberger, P., 2005. *Aspergillus oryzae* produces compounds inhibiting cholesterol biosynthesis downstream of dihydrolanosterol. FEMS Microbiology Letters 242 155–159.

Hajjaj, H., Niederberger, P., and Duboc, Ph., 2001. Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. Appl. Environ. Microbiol. 67, 2596-2602.

Hendrickson, L., Davis, C. R., Roach, C., Nguyen, D. K., Aldrich, T., McAda, P. C. and Reeves, C. D., 1999. Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. Chemistry & Biology Vol:6 No.7 p.429-439.

Heper, G. 2007. Kardiyovasküler hastalık risk tahmin ve tedavi yaklaşımında toplumsal stratejiler. Türk J Cardiol.10: 34-44.

Hoffmeister, D., Keller, N. P., 2007. Natural products of filamentous fungi: enzymes, genes, and their regulation. Nat Prod Rep 24, 393-416.

Huang, H. N., Hua, Y. Y., Bao, G. R. and Xie, L. H. 2006. The Quantification of Monacolin K in Some Red Yeast Rice from Fujian Province and the Comparison of the Other Product. Chem. Pharm. Bull. 54(5) 687- 689.

Hutchinson, C. R., Kennedy, J., Park, C., Kendrew, S, Auclair, K. and Vederas, J., 2000. Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. Antonie van Leeuwenhoek 78: 287–295.

Infectious Disease Society of America, 2010. http://www.idsociety.org/IDSA2010.htm

IMS Health, http://www.imshealth.com/

Istvan, E. S., Deisenhofer, J., 2001. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase. Science 292:1160–1164.

İrat, A. M. ve Işık, A. C., 2006. HMG-Ko A Redüktaz inhibitörlerinin pleiotropik etkileri. Ankara Ecz. Fak. Derg. 35 (3) 197 – 209.

Jaivel, N. and Marimuthu, P., 2010. Isolation and screening of lovastatin producing microorganisms. International Journal of Engineering Science and Technology Vol. 2 (7): 2607-2611.

Jaivel, N. and Marimuthu, P., 2010. Strain improvement of *Aspergillus terreus* for increased lovastatin production. International Journal of Engineering Science and Technology Vol. 2 (7): 2612-2615.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Jaivel, N. and Marimuthu, P., 2010. Optimization of lovastatin production in solid state fermentation by *Aspergillus terreus*. International Journal of Engineering Science and Technology Vol. 2 (7): 2730-2733.

Jia, Z., Zhang, X., Zhao, Y. and Cao, X., 2010. Enhancement of Lovastatin Production by Supplementing Polyketide Antibiotics to the Submerged Culture of *Aspergillus terreus*. Appl Biochem Biotechnol. 160: 2014–2025.

Karakoç, Ş. and Aksöz N., 2006. Some Optimal Cultural Parameters for Gibberellic Acid Biosynthesis by *Pseudomonas* sp. Turk J Biol 30: 81-85.

Kasetsart, J., 2009. Pigments and Anti-Cholesterol Agent Production by *Monascus* kaoliang KB9 and Its Color Mutants in Rice Solid Cultures. Nat. Sci. 43: 696 - 702.

Kennedy, J, Auclair, K, Kendrew, S. G., Park, C, Vederas, J. C. & Hutchinson C. R., 1999. Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. Science 284: 1368–1372.

Kumar, M. S, Jana, S. K, Senthil, V, Shashanka, S, Kumar S. V, Sadhukhan, AK., 2000. Repeated fed batch process for improving lovastatin production. Process Biochem. 36: 363–8.

Kumar, M. S., Kumar, P. M., Sarnaik, H. M., Sadhukhan, A. K. 2000. A rapid technique for screening of lovastatin-producing strains of *Aspergillus terreus* by agar plug and *Neurospora crassa* bioassay.Journal of Microbiological Methods 40 99–104.

Konya, A, Jekkel, A, Suto, J, Salat, J., 1998. Optimization of compactin fermentation. J. Ind. Microbiol Biotechnol. 20: 150-152.

Küçük, Ç., Kıvanç, M., Kınacı, E. ve Kınacı, G., 2003. Antifungal Peptidler. Orlab On-Line Mikrobiyoloji Dergisi, 1(10):1-8.

Lai, L. S. T., Hung, C. S., and Lo, C. C., 2007. Effects of Lactose and Glucose on Production of Itaconic Acid and Lovastatin by *Aspergillus terreus* ATCC 20542. The Society for Biotechnology, Japan. Vol. 104, No. 1, 9–13.

Lai, L. S. T., Tsai, T. H., Wang, T. C., Cheng T. Y., 2005. The influence of culturing environments on lovastatin production by *Aspergillus terreus* in submerged cultures. Enzyme and Microbial Technology. 36: 737–748.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Lai, L. T., Wang, T. C., and Cheng, T. Y., 2004. Investigation on the production kinetics of lovastatin by *Aspergillus terreus* in a 5 L fermentor. Fung. Sci. 19(3–4): 97–107.

Lee C. K., Kim D.Y., Suh J. W. and Chang J. H., 2004. *Streptomyces* sp. CJPV975662 capable of converting compactin to pravastatin and Method for producing pravastatin using the same. Patent Appl. Pub. US Patent /0253692 A1.

Lee, C. L., Tsai, T. Y., Wang, J. J. and Pan, T. M., 2006. In vivo hypolipidemic effects and safety of low dosage *Monascus* powder in a hamster model of hyperlipidemia. Appl Microbiol Biotechnol 70: 533–540.

Lee, C. L., Wang, J. J., Kuo, S. L. and Pan, T. M., 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol-lowering agent—monacolin K and antiinflammation agent—monascin.. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 72, No 6.

Lindequist U., Niedermeyer T. H. J., Jülich W., 2005. The Pharmacological Potential of Mushrooms, eCAM 2: 285-299.

Ma, S. M., Pickens, L. B., Tang, Y., 2009. Antibiotics, Polyketides. Encyclopedia of Industrial Biotechnology.

Macreadie, I. G., Johnson, G., Schlosser, T. & Macreadie, P. I., 2006. Growth inhibition of *Candida* species and *Aspergillus fumigatus* by statins. FEMS Microbiol Lett 262 9–13.

Manzoni, M., Rollini, M., Bergomi, S., Cavazzoni, V., 1998. Production and purification of statins from *Aspergillus terreus* strains. Biotechnol. Tech. 12, 529–532.

Manzoni, M., Bergomi, S., Rollini, M., and Cavazzoni, V., 1999. Production of statins by filamentous fungi. Biotechnol. Lett. 21, 253-257.

Manzoni, M, Rollini, M. 2002. Biosynthesis and biotechnological production of statins by filamentous fungi and application of these cholesterollowering drugs. Appl Microbiol Biotechnol. 58: 555–564.

Manzoni, M., Rollini, M., 2006. Influence of medium design on lovastatin and mevastatin production by *Aspergillus terreus* strains. Annals of Microbiology, 56 (1) 47-51.

Mihos, C. G. And Santana O., 2011. Pleiotropic effects of the HMG-CoA reductase inhibitors. International Journal of General Medicine. 4:261–271.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Misiek, M., Hoffmeister, D., 2007. Fungal genetics, genomics and secondary metabolites in Pharmaceutical Biology. Planta Medica 73, 103-115.

Miyake, T., Uchitomi, K., Zhang, M. Y., Kono, I., Nozaki, N., Sammoto, H., Inagaki, K. 2006. Effects of the Principal Nutrients on Lovastatin Production by *Monascus pilosus*. Biosci. Biotechnol. Biochem.,70 (5), 1154-1159.

Moser, M., 1983. Keys to Agarics and Boleti, Gustav, Fischer Verlag, Stuttgard.

Nirogi, R., Mudigonda, K., Kandikere, V., 2007. Chromatography–mass spectrometry methods for the quantitation of statins in biological samples.Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 44: 379–387.

Oskay, M and Tamer, A. U., 2009. Antibiotics derived from the genus *Streptomyces*. Ecological Life Sciences, 5A0008, 4, (2), 48-60.

Pahan, K., 2006. Lipid-lowering drugs. Cell. Mol. Life Sci. 63: 1165–1178.

Panda, B. P., Javed, S. and Ali, M., 2008. Optimization of Fermentation Parameters for Higher Lovastatin Production in Red Mold Rice through Co-culture of *Monascus purpureus* and *Monascus ruber*. Food Bioprocess Technol. Springer Science.

Panda, B.P., Javed, S. and Ali, M., 2009. Engineering Rice Based Medium for Production of Lovastatin with *Monascus* Species. Reactor Ind. Eng. Chem. Res., , 45 (13), pp 4837–4843.Vol. 27, No. 5: 352–360.

Pansuriya, R. C. and Singhal, R. S., 2010. Response surface methodology for optimization of production of lovastatin by solid state fermentation. Brazilian Journal of Microbiology 41: 164-172.

Papaspyridi, L. M., Katapodis, P., Gonou-Zagou, Z., Kapsanaki-Gotsi, E., Christakopoulos, P., 2007. Studies on the production of statins by greek isolates of Basidiomycetes. Journal of Biotechnology 131S S61–62.

Pepedil, F., Güven, G. S., 2009. Statinler her derde deva mı?, Hacettepe Tıp Dergisi, 40, 169-75.

Phillips, R., 1981. Mushroom and other fungi of Great Britain and Europe, London: Pan Books Ltd.

Plackett, R. L. and Burman, J. P., 1946. The Design of Optimum Multifactorial Experiments, Biometrika 33 (4), p. 305-25, June 1946.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Porcel, E. M. R., Casas López, J. L.,Sánchez Pérez, J. A., Fernández Sevilla, J. M., García Sánchez, J. L., and Chisti, Y., 2006. *Aspergillus terreus* Broth Rheology, Oxygen Transfer, and Lovastatin Production in a Gas-Agitated Slurry. Ind. Eng. Chem. Res., 45 (13): 4837–4843.

Poucheret, P., Fons, F. and Rapior, S. 2006. Biological and pharmacological activity of higher fungi: 20-year retrospective analysis. Cryptogamie, Mycologie, 27(4): 1.

Rajasekaran, A. Kalaivani, M. And Sabitha, R.,2009. Anti-diabetic activity of Aqueous extract of *Monascus purpureus* fermented rice in high cholesterol diet fed–streptozotocin- induced diabetic rats. Asian Journal of scienific research 2 (4): 180-189.

Rho, M. C., H. S. Lee, K. T. Chang, H. Y. Song, O. E. Kwon, S. W. Lee, J. S. Ko, S. G. Hong, and Y. K. Kim., 2002. Phenylpyropene C, a new inhibitor of acyl-CoA: cholesterol acyltransferase produced by *Penicillium griseofulvum* F1959. J. Antibiot. (Tokyo) 55: 211-214.

Samiee, S. M., Moazami, N., Haghighi, S., Mohseni, F. A., Mirdamadi, S. and Bakhtiari, M. R., 2003. Screening of Lovastatin Production by Filamentous Fungi. Iranian Biomedical Journal 7 (1): 29-33

Sayyad, S. A., Panda, B. P., Javed, S., Ali, M., 2007. Optimization of nutrient parameters for lovastatin production by *Monascus purpureus* MTCC 369 under submerged fermentation using response surface methodology. Appl Microbiol Biotechnol 73: 1054–1058.

Seenivasan, A, Subhagar, S, Aravindan, R, Viruthagiri, T., 2008. Microbial production and biomedical applications of lovastatin. Indian J.Pharm. Sci. 70:7 01-709.

Shaligram, N. S., 2009. Effect of precultural and nutritional parameters on compactin production by solid-state fermentation. J Microbiol Biotechnol 19:690.

Shindia, A. A., 1997. Studies on mevinolin production by some fungi. Microbios 102, 53–61.

Shindia, A. A., 2001. Some Nutritional Factors Influencing Mevinolin Production by *Aspergillus terreus* Strain.Folia Microbiol. 46(5),413-416.

Sinensky, M. and Logel, J., 1983. Inhibition of Degradation of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase by Mevinolin. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 258, No. 14, Issue of July 25, p. 8547-8549.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Sorensen, J. L., Auclair, K., Kennedy, J., Hutchinson C. R. and Vederas J. C., 2002. Transformations of cyclic nonaketides by *Aspergillus terreus* mutants blocked for lovastatin biosynthesis at the lovA and lovC genes. Org. Biomol. Chem.1:50–59.

Srinu, M., Phanibhushan, G. V., Moges, F., Srilakshmi, J., Sankar, G., Prabhakar, T., Lakshminarayana, K., 2010. Screening of HMG CoA a Reductase inhibiotor producing marine *Actinomycetes*. JPHRC. Vol 2 (1): 66-74.

Stamets, P., 2005. Mycelium Running: How Mushrooms Can Help Save the World. Ten Speed Press, Berkeley, California.

Su, Y. C., Wang, J. J., Lin, T. T., & Pan, T. M., 2003. Production of secondary metabolites, γ-amino butyric acid and monacolin K by Monascus. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 30(1), 41–46.

Subhagar, S., Aravindan, R., Viruthagiri, T., 2009. Response surface optimization of mixed substrate solid state fermentation for the production of lovastatin by *Monascus purpureus*. Eng Life Sci 9:303–310 12.

Suryanarayan, S., Mazumdar, K., 2001. Solid state fermentation. U.S. Patent 6,197,573.

Szakàcs, G., Morovjàn, G., Tengerdy, R.P., 1998. Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. Biotechnol. Lett. 20, 411–415.

Tabernero, L., Rodwell, V. W., and Stauffacher, C. V., 2003. Crystal Structure of a Statin Bound to a Class II Hydroxymethylglutaryl-CoA Reductase. The Journal of Biological Chemistry. Vol. 278, No. 22, Issue of May 30, p.19933–19938.

Tanimoto, T., Tsujita, Y., Hamano, K., Haruyama, H., Kinoshita, T., Hosoya, T., Kaneko, S., Tago, K. & Kogen, H., 1996. Schizostatin, a potent squalene synthase inhibitor from *Schizophyllum commune* II. Structure Elucidation and Total Synthesis.The Journal of Antibiotics p.624- 630.

Tobert, J. A., 2003. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. Nature Review Drug Discovery, 2(7), 517–526.

Tsukahara, M., Shinzato, N., Tamaki, Y., Namihira, T., Matsui, T., 2009. Red Yeast Rice Fermentation by Selected Monascus sp. with Deep-Red Color, Lovastatin Production but No Citrinin, and Effect of Temperature-Shift Cultivation on Lovastatin Production, Appl Biochem Biotechnol, 158, 476-82.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam ediyor)

Ulusal Kalp Sağlığı Politikası, 2007. http://www.tkd.org.tr/pages.asp?pg=276

Ünyayar, S., 2000. Production of gibberellic acid and cytokinin by *Phanerochaete chrysosporium* ME446 immobilized on polyurethane foam. Turkish Journal of Biology, Vol. 24 No. 3 pp. 513-519.

Valera, H. R., Gomes, J., Lakshmi, S., Gururaja, R., Suryanarayan, S., Kumar, D., 2005. Lovastatin production by solid state fermentation using *Aspergillus flavipes*. Enzyme and Microbial Technology 37: 521–526.

Vaupotič, T., Veranic, P., Petrovič, U., Gunde-Cimerman, N. and Plemenitaš, A., 2008. HMG-CoA reductase is regulated by environmental salinity and its activity is essential for halotolerance in halophilic fungi. Studies in Mycology 61: 61–66.

Vilches Ferrón, M. A., Casas López, J. L., Sànchez Pèrez, J. A., Fernàndez Sevilla, J. M. and Chisti, Y., 2005. Rapid screening of *Aspergillus terreus* mutants for overproduction of lovastatin. World Journal of Microbiology & Biotechnology 21: 123–125.

Vuletić, M., Cindrić, M., Koružnjak, J. D., 2005. Identification of unknown impurities in simvastatin substance and tablets by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 37: 715–721.

Wasser, S., 2002. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunomodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 60(3):258-274.

Williamson, J. M., 1989. HMG–CoA reductase inhibitor produced by *Nocardia* sp. (MA6455). European Patent A20337548.

Xiu-Sheng, M., Chris, D., 2003. Metcalfe Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, J. of Chrom. A 998:133-14.

Xu B. J., Wang, Q. J., Jia, X. Q., Sung, C. K., 2005. Enhanced lovastatin production by solid state fermentation of Monascus ruber. Biotech. Bioproc. Eng. 10(10): 78-84.

Zhuge, B., Fang, H. Y., Yu, H., Rao, Z. M., Shen, W., Song, J. and Zhuge, J., 2008. Bioconversion of lovastatin to a novel statin by *Amycolatopsis sp.* Appl Microbiol Biotechnol 79: 209–216.